



**Инструкция
по применению комплекта реагентов для выделения
ДНК
«ДНК-FAST-ФАКТОР»**

ТУ 21.10.60-358-51062356-2022

Общая информация.

Комплект реагентов предназначен для экстракции (выделения) ДНК из биологического материала животного происхождения для последующего анализа методом полимеразной цепной реакции.

Принцип метода.

Экспресс-методика основана на клеточном лизисе с последующей нейтрализацией ингибиторов. Экстракция ДНК из исследуемого образца занимает около 15 минут.

Материал для исследования.

Мазки со слизистой носоглотки, ротоглотки, конъюнктивы, из влагалища и др., фрагменты тканей и органов (печень, легкие, селезенка), трахея, воздухоносные мешки, миндалины, лимфатические узлы, кишечник, семенники с придатками, плацента, плодовые оболочки, абортировавших животных, фрагменты поражённых кожных покровов, содержимое брюшной полости и желудка, фекалии, помет птиц, моча, молоко, содержимое бурс, гигром, сперма, куриные эмбрионы, яйца, продукты животного происхождения: куски мяса, фарш, мясные полуфабрикаты и т.п.), цельная кровь, сыворотка крови; культуры микроорганизмов и питательные среды; смывы с поверхностей.

Количество определений.

Комплект реагентов предназначен для применения только *in vitro* и рассчитан на выделение ДНК из 100 исследуемых образцов, включая контрольные.

Состав комплекта.

Раствор для экстракции FAST – 100 пробирок (300 мкл в каждой).

Вода для разведения выделенных образцов dd H₂O – 20 мл.

Примечание: Комплект реагентов может использоваться в качестве транспортной среды.

Взятие и подготовка биологического материала к выделению ДНК.

- **Мазки** (со слизистой носоглотки, ротоглотки, конъюнктивы, из влагалища и др.) забирают с помощью стерильного зонда, зонд помещают в пластиковую микропробирку объемом 1,5 мл с 0,5 мл стерильного физиологического раствора.

- **Мочу** после сбора отстаивают в течение 1 часа, затем осторожно сливают, оставляя придонную часть – около 10 мл. Центрифугируют при 5000-6000 g 10 мин, если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл его используют для экстракции НК. До получения осадка мочу нельзя охлаждать или замораживать.

- **Ликвор, слюна, синовиальная жидкость** собрать около 0,5 мл в стерильную 1,5 мл пробирку. Центрифугировать 5 минут при 12000 об/мин. Отобрать надосадочную жидкость не захватывая осадок, добавить к осадку 0,5 мл стерильного физиологического раствора, перемешать и центрифугировать 2 минуты при 12000 об/мин. Аккуратно отобрать надосадочную жидкость. Добавить к осадку все содержимое пробирки реактива для выделения ДНК, тщательно перемешайте пипетированием и образовавшийся раствор перенесите обратно в пробирку с реагентом.

- **Фрагменты тканей и органов** - кусочки паренхиматозных органов (печень, легкие, селезенка), трахея, воздухоносные мешки, миндалины, лимфатические узлы, кишечник, семенники с придатками, плацента, плодовые оболочки, абортировавших животных, фрагменты поражённых кожных покровов и др отбирают в стерильный контейнер.

- **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 отбирают в стерильный контейнер.

- **Сперма и секрет простаты** 20-30 мкл материала поместить в 1,5 мл пробирку с 0,5 мл стерильного физиологического раствора, центрифугировать 5 минут при 12000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость максимально не захватывая осадок. Добавить к осадку все содержимое пробирки реактива для выделения ДНК, тщательно перемешайте пипетированием и образовавшийся раствор перенесите обратно в пробирку с реагентом.

- **Кал и помет** готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе.

- **Содержимое бурс, гигром** помещают в пробирку с раствором для выделения ДНК.

- **Цельная кровь** Кровь забирается в пробирку с 6 % ЭДТА из расчета 50 мкл раствора ЭДТА на 1 мл крови, закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

Примечание. При заборе материала необходимо избегать попадания постороннего материала (слизь, гной и пр.) в пробирку, а также не допускать избыточного количества материала.

Допускается транспортировка образцов в течение 12 часов при температуре 2–8°C или хранение при -20°C в течение 14 дней.

- **Сыворотка крови.** 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 на центрифуге «MiniSpin», Eppendorf, Германия) в течение 10 минут при комнатной температуре. Сыворотку переносят отдельными наконечниками с фильтром в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

- **Культуры микроорганизмов** в жидких средах отбирают в стерильную тару.

- **Бактериальные колонии** ресуспендируют в 0,5 мл физиологического раствора.

- **Питательные среды** отбирают в стерильную тару (твердые можно ресуспендировать в физиологическом растворе).

- **Смывы с поверхностей** (тары, кормушек, мест содержания животных и др.) отбирают в стерильную тару с 0,5 мл физиологического раствора. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

Выделение ДНК из биологического материала.

1. Отобрать необходимое количество пробирок (содержащих раствор для экстракции FAST) 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, если он предусмотрен для конкретного исследования.

2. В пробирку ВК- внести 100 мкл ОКО¹ (также из комплекта конкретного Набора реагентов для амплификации ДНК). В остальные пробирки с раствором для экстракции FAST и ВКО (если используется) внести по 100 мкл проб (если проба жидкая, либо кусочек с примерным размером 3х3х3 мм, если проба твердая). В случае выделения НК из цельной крови используют пробу в объеме 300 мкл.

3. Перемешать пробирки «ДНК-FAST-ФАКТОР» с добавленными анализируемыми образцами на микроцентрифуге/вортексе в течение 20 сек.

4. Поместите пробирки в термостат при 98°C в течение 10 мин.
Примечание: Термостат должен быть предварительно прогрет до 98°C. Может использоваться термостат с прижимной крышкой.

5. Центрифугируйте пробирки при 12000 об/мин в течение 2 мин. В результате центрифугирования может образоваться осадок.

6. Используйте надосадочную жидкость для постановки ПЦР.

¹ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

Перед постановкой ПЦР для предупреждения ингибирования необходимо развести полученные пробы в 10 раз. Если после разведения в ПЦР отсутствует сигнал по всем каналам – необходимо последовательно развести образцы еще в 10 раз (итого разведение в 100 раз).

Для разведения выделенных образцов необходимо использовать входящую в комплект dd H₂O.

Выделенная ДНК может храниться при температуре 2–8°C в течение недели или при -20°C до 6 месяцев.

Условия хранения и транспортировки.

Комплект реагентов для выделения «ДНК-FAST-ФАКТОР» следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности комплекта.

Срок годности комплекта – 12 месяцев с даты изготовления.

Транспортировку комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре 2–8°C.

Допускается транспортировка и хранение комплекта «ДНК-FAST-ФАКТОР» при температуре 18–25°C в течение 2 – 3 суток.

Приложение 1. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 16.01.2020	По тексту	В комплект реагентов добавлена dd H ₂ O для разведения выделенных образцов
Версия 1.2 от 03.12.2020	По тексту	Добавлена сыворотка крови в качестве исследуемого материала
Версия 1.3 от 28.05.2021	стр. 4	Добавлена сноска, поясняющая, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.4 от 13.07.2021	стр. 4	Изменены рекомендации по разведению образцов
Версия 1.5 от 30.11.2021	По тексту	Добавлен биоматериал: культуры микроорганизмов, питательные среды, смывы с поверхностей
Версия 1.6 от 21.02.2022	Стр. 3	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке

По вопросам качества набора реагентов **«ДНК-FAST-ФАКТОР»**
или по вопросам приобретения тест-систем нашего производства,
просьба обращаться в ООО «ВЕТ ФАКТОР» по адресу:
108840, Россия, г. Москва, г. Троицк, ул. Промышленная д.2,
Тел: 8 (499) 271-71-26, добавочный 243,
Email: vet@faktor.ru