



**Инструкция
по применению набора реагентов
для экстракции (выделения) ДНК из растительного сырья,
продуктов питания и кормов для животных, для последующего
проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР)
«ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР»**

ТУ 21.10.60-336-51062356-2022

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 материалы	6
5. Взятие клинического материала. Транспортирование и хранение проб	7
5.1 Отбор образцов	7
5.2 Пробоподготовка	8
6. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	9
7. Условия хранения и транспортировки	10
8. Срок годности	10
Приложение 1. Лист вносимых изменений	11

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
НК	нуклеиновая кислота
ВК-	отрицательный контроль экстракции

1. Назначение

Комплект реагентов предназначен для экстракции (выделения) ДНК из растительного сырья, продуктов питания и кормов для животных, для последующего проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Характеристика набора

2.1 Принцип действия

Материал обрабатывается лизирующим раствором на основе гуанидина. В результате происходит деструкция клеточных мембран и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК 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 и №3). При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием.

В результате получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов, что обеспечивает успешное проведение реакции ПЦР.

2.2 Состав набора

Набор рассчитан для экстракции ДНК и выпускается в двух вариантах:

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

Состав набора приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Лизирующий раствор	прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость	45	90	1
2	Протеиназа К ¹	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,95	1,9	1
3	Раствор для отмывки №1	прозрачная бесцветная жидкость	30	60	1
4	Раствор для отмывки №2	прозрачная бесцветная жидкость	30	60	1
5	Раствор для отмывки №3	прозрачная бесцветная жидкость	30	60	1
6	Сорбент универсальный	суспензия серо-коричневого цвета	2,8	2,8	1 (2)
7	Буфер для элюции ДНК	прозрачная бесцветная жидкость	7	13	1

3. Меры предосторожности

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей ПЦР исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением требований СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

При работе необходимо выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СанПиН 3.3686-21.
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы и реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СанПиН 3.3686-21.
- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности следует утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21.
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду

¹ Следует хранить при температуре -18-20 °С

(пробки, наконечники) необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.

- Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, до начала и после завершения работ необходимо подвергать ультрафиолетовому облучению в течение 30 минут.

- Применять набор строго по назначению согласно данной инструкции.
- Допускать к работе только специально обученный персонал.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

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

4. Оборудование и материалы.

4.1 Для зоны выделения ДНК из клинического материала:

- настольный бокс с бактерицидной лампой или стерильный ламинарный шкаф;

- твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 мл (диапазон температур - 25-100°C);

- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 14 тыс. об./мин;

- вортекс;

- пипетки автоматические одноканальные переменного объема 50-200 и 200-1000 мкл (например, «Ленпипет», Россия);

- одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл;

- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 100 и 1000 мкл в штативах;

- перчатки медицинские неопудренные латексные;

- штативы для микропробирок на 1,5-2 мл;

- емкость с дезинфицирующим средством;

- холодильник бытовой на 2-8°C и на минус 20°C;

- халат лабораторный.

5. Взятие клинического материала. Транспортирование и хранение проб

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими указаниями МУ 2.3.2.1917-04 «Порядок и организация контроля за пищевой продукцией, полученной из/или с использованием сырья растительного происхождения, имеющего генетически-модифицированные аналоги»

Материалом для исследования служат:

- Фрукты и овощи;
- Части растений;
- Пищевые продукты, в том числе содержащие компоненты растительного происхождения;
- Пищевое сырье растительного происхождения;
- Корма для животных;
- Биодобавки, кормовые и пищевые добавки (в т.ч., мясокостная мука).

5.1 Отбор образцов

- От партии сырья или сыпучих продуктов отбирают общую пробу следующим образом:
 - от исследуемой партии сырья или сыпучих продуктов отбирают не менее 10 образцов проб (по 5-10 г) в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20х30 см с использованием одноразовых хирургических перчаток и перемешивают, формируя общую пробу (50-100 г);
 - из общей пробы отбирают среднюю пробу в 10-20 г, помещают в полиэтиленовый пакет с застежкой-молнией размером не более 10х15 см, который, в свою очередь, помещают в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет размером 20х30 см, опечатывают и отправляют на анализ.
- От партии продуктов плотной консистенции отбирают общую пробу весом 10-50 г в одноразовый плотный полиэтиленовый пакет с застежкой-молнией размером не более 10 х 15 см, используя одноразовые перчатки и фламбированные инструменты, опечатывают и отправляют на анализ.
- Пробы жидких продуктов отбирают в чистые емкости из стекла или пластика с герметично закрывающимися крышками объемом не более 50 мл, опечатывают и отправляют на анализ.

Образцы сырья и продуктов рекомендуется хранить в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа) согласно условиям, указанным производителем продукта питания. Образцы скоропортящихся продуктов рекомендуется хранить в замороженном состоянии (при температуре не выше минус 16 °С) в течение 1 месяца (при необходимости повторного анализа).

Транспортирование образцов осуществляют при температуре, рекомендованной для хранения сырья или пищевого продукта. Длительность транспортирования не должна превышать сроков годности продукта.

5.2 Пробоподготовка.

Для подготовки проб необходимо использовать одноразовые полипропиленовые пробирки, стерильные ступки и пестики, терки, фламбированные инструменты – пинцеты, скальпели, ножницы.

Пробы плотных продуктов, сухих гранулированных и сыпучих продуктов отбирают в ступку по 5 – 10 г и растирают пестиком до гомогенного состояния. Сухие зерна предварительно замачиваются в течение суток. Гомогенизацию проб плотных продуктов также рекомендуется проводить с использованием автоматических гомогенизаторов и сопутствующих им расходных материалов.

Гомогенизированные пробы продуктов с высоким содержанием крахмалистых веществ (образующие клейстер или желеобразную массу при добавлении лизирующего раствора) весом 50-300 мг помещают в одноразовые пластиковые пробирки, добавляют 1,0 мл физиологического раствора и тщательно перемешивают, получая суспензию.

Продукты, содержащие большое количество сахаров (кукурузные хлопья с медом или сахаром, сладкая кукуруза), требуют предварительной обработки для удаления избытка углеводов:

- количество образца, отобранное для гомогенизации, предварительно следует промыть дистиллированной водой 2 раза, каждый раз удаляя воду.
- оставшееся плотное вещество затем использовать для гомогенизации.

Из полученных гомогенатов и суспензий проводят экстракцию ДНК. Для этого сухие пробы отбирают в одноразовые пластиковые пробирки (емкостью 1,5 мл) в количестве 30 - 100 мг (что соответствует объему 30-50 мкл в градуированной пробирке). Суспензии и продукты жидкой консистенции отбирают для экстракции в объеме 100 мкл.

При исследовании желатина готовят 10% суспензию. Для этого навеску желатина заливают горячим стерильным физраствором² (60-70°C), тщательно перемешивают и оставляют в термостате (60-65°C) до полного растворения (около 5 минут), периодически перемешивая. При растворении желатина объем жидкости уменьшается – в процессе растворения доливают горячий физраствор² до изначального объема, перемешивают и продолжают прогрев. После полного растворения – 100 мкл полученной суспензии используют в выделение.

Каждый образец рекомендуется отбирать на экстракцию и тестировать в двух повторах.

² Вместо физраствора допускается использование ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными.

6. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

При наличии осадка (белых хлопьев, «мутности») в лизирующем растворе – перед началом работы раствор необходимо прогреть при температуре 60°C до полного растворения осадка.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок для проб, включая пробирку для отрицательного контроля экстракции. В пробирки внести исследуемые пробы (20-40 мг сухой пробы или 100 мкл жидкой пробы). В пробирку с отрицательным контролем экстракции (ВК-) внести 100 мкл ОКО³. Промаркировать пробирки, внести в каждую пробирку по 800 мкл лизирующего раствора и по 17 мкл протеиназы. Тщательно перемешать на вортексе

2. Инкубировать смесь не менее 40 минут при температуре 65°C, периодически встряхивая на вортексе (каждые 10-15 минут).

3. Центрифугировать пробирки при максимальных об/мин в течение 15 минут.

4. Верхнюю фазу из каждой пробирки (300-500 мкл) перенести отдельными наконечниками в новые пробирки объемом 1,5 мл.

5. Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (требуется взять из набора для амплификации в случае, если он предусмотрен для анализа).

6. 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).

7. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при максимальных об/мин. в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

8. Добавить к осадку 500 мкл раствора для отмывки №1, перемешать пипеткой или на вортексе до полного ресуспендирования сорбента (получения однородного раствора). Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 12000 об./мин⁴ в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

9. Добавить к осадку 500 мкл раствора для отмывки №2, перемешать на вортексе до получения однородной суспензии. Осадить сорбент универсальный

³ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

⁴ 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

центрифугированием при 12 000 об/мин. в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

10. Добавить к осадку 500 мкл раствора для отмывки №3, перемешать на вортексе до получения однородной суспензии. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 12 000 об/мин. в течение одной минуты. Удалить супернатант с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя со сменными наконечниками.

11. Поместить пробирки в термостат при температуре 65°C на 10-15 минут для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты. Убедиться в отсутствии остатков спирта на стенках пробирок и осадке.

12. Добавить в пробирки по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции НК. Встряхнуть на вортексе до получения однородной суспензии. Прогреть пробы при температуре 65°C в течение 5 минут с закрытыми крышками. Пробы желательно встряхивать каждые 2 минуты.

13. Центрифугировать пробирки при максимальном числе оборотов в течение 1 минуты. Надосадочная жидкость содержит очищенную НК. Пробы готовы к использованию.

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.

7. Условия хранения и транспортировки

Набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 8°C в течение 5 суток.

После получения набор «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» следует разукomплектовать и хранить в соответствии со следующими требованиями:

Протеиназа К при температуре от минус 18 до минус 20°C;

Остальные компоненты при температуре от 2 до 25°C в течение всего срока годности набора.

8. Срок годности

Срок годности набора реагентов «ДНК-ПЛАНТ-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 13.08.2018	Пункт 6 « Экстракция ДНК из исследуемых образцов»	По тексту
Версия 1.2 от 21.09.2020	Пункт 6 « Экстракция ДНК из исследуемых образцов»	Добавлена рекомендация прогрева лизирующего раствора (при наличии осадка) перед работой
Версия 1.3 от 12.02.2021	Таблица 1 «Состав набора»	Изменен суммарный объем буфера для элюции ДНК/РНК
Версия 1.4 от 28.05.2021	Стр. 9	Добавлена сноска, поясняющая, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.5 от 01.12.2021	По тексту	Добавлен и актуализирован материал: желатин, мясокостная мука

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР» либо других 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