



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов

**для экстракции (выделения) ДНК/РНК из биологического
материала, для последующего проведения полимеразной цепной
реакции (ПЦР) на станции KingFisher Flex
«ДНК/РНК-M-FLEX-ФАКТОР»**

ТУ 21.10.60-351-51062356-2022

Содержание

Список сокращений	3
1. Назначение	4
2. Характеристика набора	4
3. Меры предосторожности.	5
4. Оборудование и материалы	6
5. Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб. ...	7
6. Экстракция НК из исследуемых образцов	10
6.1. Экстракция НК из исследуемых образцов на станции KingFisher Flex	10
6.2. Экстракция НК из исследуемых образцов на системе очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 24/48/96	11
6.3. Экстракция НК ручным методом с использованием магнитного штатива..	15
7. Условия хранения и транспортировки.	18
8. Срок годности	18
Приложение 1. Лист вносимых изменений	19

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/РНК из биологического материала, для последующего проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) на станции KingFisher Flex. Также возможно использование системы очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 24/48/96.

2. Характеристика набора

2.1. Принцип действия

Биологический образец обрабатывается лизирующим раствором на основе гуанидина в присутствии частиц сорбента магнетизированного (магносорба). 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 магносорба, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК/РНК к сорбенту происходит переход ДНК/РНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частичек сорбента магнитной силой. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК/РНК, свободный от ингибиторов, что обеспечивает успешное проведение ПЦР.

2.2. Состав набора

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

- 1) для анализа 50 клинических образцов (включая контрольные образцы)
- 2) для анализа 100 клинических образцов (включая контрольные образцы).

Состав набора приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора

№	Состав комплекта	Описание	Объем, мл		Кол-во
			на 50 реакций	на 100 реакций	
1	Лизирующий раствор	прозрачная бесцветная или желтоватая жидкость	30	60	1
2	Преципитирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость	6	12	1
3	Протеиназа К	прозрачная бесцветная вязкая жидкость	0,5	1	1
4	Раствор для отмывки №1	прозрачная бесцветная жидкость	20	35	1
5	Раствор для отмывки №2	прозрачная бесцветная жидкость	55	110	1
6	Сорбент магнетизированный, магносорб	суспензия черного цвета	1	2	1
7	Буфер для элюции ДНК/РНК	прозрачная бесцветная жидкость	6	12	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 (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.

- 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 100°C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия);
- автоматическая станция выделения нуклеиновых кислот KingFisher Flex или аналогичные;
- вортекс (например «ТЭТА-2», «Биоком», Россия);
- пипетки автоматические одноканальные переменного объема 50-200 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 до 200 и 1000 мкл в штативах (например, фирмы «Ахуген», США);
- одноразовые кондуктивные наконечники с фильтром для станции
- перчатки медицинские неопудренные латексные;
- штативы для микропробирок на 1,5-2 мл (например, «Ахуген», США);
- емкость с дезинфицирующим средством;
- холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой от минус 24 до минус 18 °C;
- халат лабораторный
- набор для выделения ДНК/РНК.

5. Взятие биологического 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.

5.1. Отбор проб

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

- Целная 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, ротоглотки, конъюнктивы, из влагалища и др.) 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 1х1х1 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.

- Бактериальные колонии, ресуспендируют в небольшом объеме (200-500 мкл) физиологического раствора.

- Смывы с поверхностей (тары, кормушек, мест содержания животных и т.д.).

- ФТА-карты

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 ВЕТ ФАКТОР):

- 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.

5.2. Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК:

Подготовка исследуемого биоматериала подробно описана в инструкции по применению используемого набора реагентов для проведения ПЦР.

- Пробы цельной крови, плазму крови, синовиальную жидкость, пунктаты из лимфоузлов, мазки со слизистой носоглотки, ротоглотки, конъюнктивы, из влагалища и др., содержимое бурс и гидром, культуры микроорганизмов, смывы с поверхностей обычно используют для выделения ДНК/РНК без предварительной подготовки. Смывы с поверхностей, взятые для проверки наличия внутрилабораторной контаминации, выделять не нужно.

- Для получения плазмы пробирку с цельной кровью центрифугируют в течение 10 мин при 5400 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»,

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.

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.

- Пробы тканей и органов, а также пробы продуктов животного происхождения (в т.ч. мясокостной муки) гомогенизируют с использованием стерильных фарфоровых ступок и пестиков, затем обычно готовят 10% суспензию на стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируют при 2 тыс. об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 5-10 минут. Надосадочную жидкость используют для экстракции НК. В некоторых случаях образовавшуюся суспензию не центрифугируют, а отстаивают при комнатной температуре в течение 15-30 мин, затем верхнюю фазу по 0,4-0,5 мл переносят пастеровской пипеткой (или наконечником с аэрозольным барьером) в пробирки на 1,5 мл, и в количестве 0,1 мл используют для выделения НК.

- 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. Если нет возможности исследовать мочу в течение 24 ч после взятия, в образец вносят глицерин (в количестве 10% от объема пробы), перемешивают и замораживают.

- 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.

- Образцы на ФТА-картах разрезают на небольшие кусочки (примерно 3x3 мм), помещают в пробирку с 600 мкл Лизирующего раствора и прогревают при 56°C 30 мин, перемешивая каждые 30-60 сек. После этого центрифугируют 12000 об./мин² («MiniSpin», «Eppendorf») в течение 2 минут, после чего отбирают надосадочную жидкость в отдельную пробирку, добавляют туда ВКО (при наличии), прогревают в течение 2 мин при 60°C. Далее при автоматическом

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

выделении полученный надосадок вносят в лунки вместо 600 мкл лизирующего раствора и 100 мкл пробы и продолжают выделение согласно инструкции (начиная с пункта 6.1.4 или 6.2.3 в зависимости от типа станции). При ручном выделении вносят ВКО (при наличии) и продолжают выделение с пункта 6.3.3.

6. Экстракция НК из исследуемых образцов

6.1. Экстракция НК из исследуемых образцов на станции KingFisher Flex

Перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 необходимо прогреть при температуре 60°C в течение 10 минут.

1. Включить прибор KingFisher Flex. Убедиться, что станция промыта и готова к работе. Приготовить четыре 96-луночных планшета с глубокими ячейками, два планшета на 200 мкл и одну гребёнку наконечников. Планшеты с глубокими ячейками подписать:

Первый планшет – L (в этот планшет будет вноситься лизирующий раствор)

Второй – W1 (в этот планшет будет вноситься раствор для отмывки №1)

Третий и четвертый планшет – W21 и W22 (в этот планшет будет вноситься раствор для отмывки №2)

2. В лунки одного планшета на 200 мкл внести по 100 мкл буфера для элюции. Во второй планшет на 200 мкл установить гребёнку наконечников.

3. Внести в планшеты с глубокими лунками следующие растворы (число заполняемых лунок равно числу образцов для экстракции, включая ОКО):

3.1 В лунки планшетов «W1» внести по 300 мкл раствора для отмывки 1 на одну точку выделения

3.2 В лунки планшета «W21» внести по 500 мкл раствора для отмывки 2 на одну точку выделения

3.3 В лунки планшета «W22» внести по 500 мкл раствора для отмывки 2 на одну точку выделения.

4. Тщательно ресуспендировать магносорб на вортексе. Пробирки с протеиназой К, ВКО и ОКО осадить кратковременным центрифугированием.

Подготовить необходимое количество магномикса из расчета на одну точку выделения:

20 мкл магносорба

10 мкл протеиназы К

10 мкл ВКО (если требуется)

В лунки первого планшета с глубокими ячейками (который был подписан Л) внести по 40 мкл магносмеси (смесь магносорба, протеиназы К и ВКО), по 600 мкл лизирующего раствора и по 120 мкл преципитирующего раствора. Далее в лунки этого планшета необходимо внести по 100 мкл исследуемых проб. В

пробу для контроля выделения (ВК-) необходимо внести 100 мкл ОКО³. В случае выделения ДНК преципитирующий раствор вносить не требуется.

В случае использования набора целиком во флакон с лизирующим раствором перелить содержимое флакона с преципитирующим раствором, с магнитным сорбентом, пробирок с протеиназой и ВКО. Закрыть флакон и перемешать содержимое. Внести в лунки планшета L по 760 мкл полученной смеси. Во время раскапки необходимо периодически встряхивать смесь!

5. На приборе с помощью кнопок перемещения выбрать раздел «DNA/RNA», в нём выбрать протокол «Vet2», нажать кнопку «Start».

6. Откройте раздвижную дверцу, если прозрачная крышка на месте.

7. Установите планшеты в специально отведенное место в соответствии с протоколом. После установки каждого из планшетов нажимайте кнопку **start** для подтверждения установки.

Обозначения планшетов в протоколе станции (в порядке появления на дисплее станции):

- 1) TipPickUp_plate – планшет на 200 мкл с гребёной
- 2) Elution – планшет на 200 мкл с буфером для элюции
- 3) WB7_DW96 – планшет «W21»
- 4) WB6_DW96 – планшет «W22»
- 5) WB5_DW96 – планшет «W1»
- 6) Samples_DW96 – планшет «L»

8. По окончании процесса снимите все планшеты в соответствии с протоколом. Подтверждайте снятие каждого планшета нажатием кнопки **start**. Следует иметь в виду, что планшет, в котором находятся ваши образцы, должен сниматься первым.

9. В конечном итоге на дисплее появляется надпись END_OF_RUN (конец цикла). По окончании цикла нажмите кнопку **stop**.

10. Выключите KingFisher Flex.

Для предотвращения контаминации все рабочие поверхности станции и штативы, а также штативы, в которых производилась подготовка образцов, рекомендуется обрабатывать после каждого раунда выделения.

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.

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

6.2. Экстракция НК из исследуемых образцов на системе очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 24/48/96

Перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 необходимо прогреть при температуре 60°C в течение 10 минут.

1. Приготовить 6 планшетов, подписать:

Первый планшет – в этот планшет установить грёбенки наконечников.

Второй планшет – L (в этот планшет будет вноситься лизирующий раствор).

Третий – W1 (в этот планшет будет вноситься раствор для отмывки №1).

Четвертый и пятый планшет – W21 и W22 (в эти планшеты будет вноситься раствор для отмывки №2).

Шестой планшет – E (в этот планшет будет вноситься буфер для элюции).

2. Внести в планшеты следующие растворы (число заполняемых лунок равно числу образцов для экстракции, включая ОКО):

2.1. В лунки планшетов «W1» внести по 300 мкл раствора для отмывки 1 на одну точку выделения.

2.2. В лунки планшета «W21» внести по 500 мкл раствора для отмывки 2 на одну точку выделения.

2.3. В лунки планшета «W22» внести по 500 мкл раствора для отмывки 2 на одну точку выделения.

2.4. В лунки планшета «E» внести по 100 мкл буфера для элюции на одну точку выделения

3. Тщательно ресуспендировать магносорб на вортексе. Пробирки с протеиназой К, ВКО и ОКО осадить кратковременным центрифугированием.

Подготовить необходимое количество магномикса из расчета на одну точку выделения:

20 мкл магносорба

10 мкл протеиназы К

10 мкл ВКО (если требуется)

В лунки второго планшета (который был подписан L) внести по 40 мкл магносмеси (смесь магносорба, протеиназы К и ВКО), по 600 мкл лизирующего раствора и по 120 мкл преципитирующего раствора. Далее в лунки этого планшета необходимо внести по 100 мкл исследуемых проб. В пробу для контроля выделения (ВК-) необходимо внести 100 мкл ОКО⁴. В случае выделения ДНК преципитирующий раствор вносить не требуется.

В случае использования набора целиком во флакон с лизирующим раствором перелить содержимое флаконов с преципитирующим раствором, с магнитным сорбентом, пробирок с протеиназой и ВКО. Закрывать флакон и

⁴ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

перемешать содержимое. Внести в лунки планшета L по 760 мкл полученной смеси. Во время раскладки необходимо периодически встряхивать смесь (каждые 2-3 ряда лунок)!

4. Включить прибор. Открыть дверцу камеры, установить планшеты с реагентами/наконечниками в соответствующий отсек на вращающемся столе, нажать на кнопку установки планшета, чтобы повернуть стол, и расставить все планшеты по очереди.

5. После включения прибора появится интерфейс запуска. В «Run Prog.» в режиме «List mode» или «Shortcut» выбрать нужную программу и нажать «Run», чтобы перейти к запуску процесса выделения нуклеиновых кислот. При запуске прибор сначала должен детектировать установленный на вращающемся столе планшет.

5. Создание программы FLEX-FACTOR.

6. Выбрать интерфейс «Manage Prog.», далее кнопку «New».

7. Кнопкой «Insert» последовательно добавлять стадии, для каждой стадии задать параметры в соответствии с фото.

- Load (параметры задаются автоматически)
- Lysis (plate 2) (задать параметры в соответствии с рис. 1)

Рисунок 1

Step	Name	Plate	Mix Time (min)	Mix Map (%)	Wait Time (min)	Volume (μl)	Mix Speed (1-10)	Temp. (°C)
1	-Load-	1						
2	Lysis	2	7.0	30	0	900	4	60

- Bind1 (plate 2) (задать параметры в соответствии с рис. 2)

Рисунок 2

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (μl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)
3	Bind1	2	0	80	0	900	5	OFF

Далее нажать на кнопку  и задать следующие параметры (рис. 3):

Рисунок 3

Step	Segments (1-5)	Cycle times (0-10)	Mag. speed (1-10)	Lip-lvl (0-30)s	Anti-splash (0-30)s	Estimated (s)
3	1	2	10	10	0	78

1st. Segment time	15 (s)	2nd. Segment time	1 (s)
3rd. Segment time	1 (s)	4th. Segment time	1 (s)
5th. Segment time	1 (s)		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

- Wash1 (plate 3) (задать параметры в соответствии с рис. 4)

Рисунок 4

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)	
4	Wash1	3	1.0	50	0	600	6	OFF	>>

- Bind2 (plate 3) (здать параметры в соответствии с рис. 5)

Рисунок 5

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)	
5	Bind2	3	0	80	0	600	5	OFF	>>

Далее нажать на кнопку >> и задать следующие параметры (рис. 6):

Рисунок 6

Step	Segments (1-5)	Cycle times (0-10)	Mag.speed (1-10)	Lip-lvl (0-30)s	Anti-splash (0-30)s	Estimated (s)	
5	1	3	5	10	10	134	<<

1st. Segment time	15	(s)	2nd. Segment time	1	(s)
3rd. Segment time	1	(s)	4th. Segment time	1	(s)
5td. Segment time	1	(s)			

- Wash2.1 (plate 4) (здать параметры в соответствии с рис. 7)

Рисунок 7

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)	
6	Wash21	4	1.0	50	0	600	6	OFF	>>

- Bind3 (plate 4) (здать параметры в соответствии с рис. 8)

Рисунок 8

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)	
7	Bind3	4	0	80	0	600	5	OFF	>>

Далее нажать на кнопку >> и задать следующие параметры (рис. 9):

Рисунок 9

Step	Segments (1-5)	Cycle times (0-10)	Mag.speed (1-10)	Lip-lvl (0-30)s	Anti-splash (0-30)s	Estimated (s)	
7	1	3	5	10	10	134	<<

1st. Segment time	15	(s)	2nd. Segment time	1	(s)
3rd. Segment time	1	(s)	4th. Segment time	1	(s)
5td. Segment time	1	(s)			

- Wash2.2 (plate 5) (здать параметры в соответствии с рис. 10)

Рисунок 10

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)
8	Wash22	5	2.0	50	0	600	6	OFF

- Bind4 (plate5) (здать параметры в соответствии с рис. 11)

Рисунок 11

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)
9	Bind4	5	0	80	0	600	5	OFF

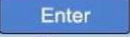
Далее нажать на кнопку  и задать следующие параметры (рис. 12):

Рисунок 12

Step	Segments (1-5)	Cycle times (0-10)	Mag.speed (1-10)	Lip-lvl (0-30)s	Anti-splash (0-30)s	Estimated (s)
9	1	3	5	10	10	134

1st. Segment time	15 (s)	2nd. Segment time	1 (s)
3rd. Segment time	1 (s)	4th. Segment time	1 (s)
5td. Segment time	1 (s)		














- Ellution (plate 8) (здать параметры в соответствии с рис. 13)

Рисунок 13

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)
10	Elution	8	7.0	50	0	200	5	60

- Bind5 (plate 8) (здать параметры в соответствии с рис. 14)

Рисунок 14

Step	Name	Plate	Mix time (min)	Mix amp (1-100%)	Wait time (min)	Volume (µl)	Mix speed (1-10)	Temp. (°C)
11	Bind5	8	0	80	0	200	5	OFF

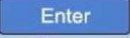
Далее нажать на кнопку  и задать следующие параметры (рис. 15):

Рисунок 15

Step	Segments (1-5)	Cycle times (0-10)	Mag.speed (1-10)	Lip-lvl (0-30)s	Anti-splash (0-30)s	Estimated (s)
11	1	3	5	10	10	116

1st. Segment time	15 (s)	2nd. Segment time	1 (s)
3rd. Segment time	1 (s)	4th. Segment time	1 (s)
5td. Segment time	1 (s)		














- Unload (задать plate 5 для сброса наконечников)

8. После завершения программы планшет № 8 (plate 8) с выделенными НК будет автоматически перемещен под прозрачную крышку с правой стороны.

9. По окончании процесса снимите все планшеты в соответствии с протоколом. Следует иметь в виду, что планшет, в котором находятся ваши образцы, должен сниматься первым.

10. Выключите Auto-Pure 24/48/96.

Для предотвращения контаминации все рабочие поверхности станции и штативы, а также штативы, в которых производилась подготовка образцов, рекомендуется обрабатывать после каждого раунда выделения.

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.

6.3. Экстракция НК ручным методом с использованием магнитного штатива

1. 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 ВКО (требуется взять из набора для амплификации в случае, если он предусмотрен для анализа данной инфекции) и по 600 мкл лизирующего раствора.

2. В пробирку ВК- внести 100 мкл ОКО⁵. (требуется взять из набора для амплификации). В остальные пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) внести по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром. В случае выделения из цельной крови пробу требуется брать в объеме 50 мкл с добавлением 50 мкл ОКО³.

3. Во все пробы внести по 10 мкл Протеиназы К.

4. Все пробы, включая пробирку ВК-, аккуратно (без вспенивания) встряхнуть на вортексе и прогреть 5 минут при 60 °C. Смесь требуется периодически перемешивать (достаточно 2-3 раза). Если после прогревания в образцах присутствуют взвешенные частицы, следует провести центрифугирование образцов при 12000 об./мин («MiniSpin», «Eppendorf») в течение одной минуты. В случае выделения ДНК из цельной крови

⁵ Вместо ОКО допускается использование физиологического раствора, ТЕ-буфера, дистиллированной воды. Реагенты должны быть чистыми и стерильными. Запрещается использовать забуференный физиологический раствор!

центрифугирование образцов обязательно! Супернатант перенести в новые пробирки.

5. Внести во все пробы по 120 мкл Преципитирующего раствора. Тщательно ресуспендировать сорбент магнетизированный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 20 мкл ресуспендированного сорбента магнетизированного.

В случае использования набора целиком во флакон с лизирующим раствором перелить содержимое флакона с преципитирующим раствором, с магнитным сорбентом, пробирок с протеиназой и ВКО. Закрывать флакон и перемешать содержимое. Внести в подготовленные пробирки по 760 мкл полученной смеси. Во время раскапки необходимо периодически встряхивать смесь!

6. Перемешать на вортексе, оставить на столе на 5 минут. Для успешной сорбции пробирки с сорбентом периодически встряхивать на вортексе (без вспенивания). Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин.

7. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.

8. Добавить к осажденному магносорбу 300 мкл раствора для отмывки №1, перемешать пипеткой или на вортексе до полного ресуспендирования сорбента (до получения однородного раствора). Поместить пробирки в магнитный штатив на 1 мин.

9. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.

10. Добавить к осадку 500 мкл раствора для отмывки №2, перемешать на вортексе до получения однородной суспензии. Поместить пробирки в магнитный штатив на 1 мин.

11. По внутренней стенке пробирки осторожно отобрать надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра для каждой пробы.

12. Повторить пункты 10 и 11. Тщательно, не захватывая магносорб, удалить жидкость полностью.

13. Поместить пробирки в термостат при температуре 60°C на 8-15 минут для подсушивания магносорба. При этом крышки пробирок должны быть открыты. Убедиться в отсутствии остатков спирта на стенках пробирок и осадке.

14. Добавить в пробирки по 100 мкл буфера для элюции НК (ТЕ буфер). 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.

15. Поместить пробирки в магнитный штатив на 2 мин. 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.

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.

7. Условия хранения и транспортировки.

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

После получения набор «ДНК/РНК-М-FLEX-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/РНК-М-FLEX-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 25.11.2019	Стр. 8-9 п. 5.2 «Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК»	Изменена пробоподготовка для продуктов и сырья животного происхождения. Изменения по тексту.
Версия 1.2 от 14.12.2020	Таблица 1 «Состав набора»	Изменен суммарный объем поставляемой отмывки 1
Версия 1.3 от 28.05.2021	стр. 10	Добавлена сноска, поясняющая, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.4 от 29.07.2021	п. 6. «Экстракция НК из исследуемых образцов», стр. 11	Добавлен порядок действий при выделении ручным методом
Версия 1.5 от 20.10.2021	Стр. 10, 11 Таблица 1 «Состав набора»	Изменено количество вносимого Преципитирующего раствора на 120 мкл. Изменения по тексту. Изменен суммарный объем поставляемого магнетизированного сорбента и лизирующего раствора.
Версия 1.6 от 21.10.2021	п. 6. Экстракция НК из исследуемых образцов	Добавлен порядок экстракции на системе очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 24/48/96. Изменения по тексту.

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.7 от 30.11.2021	п. 5. «Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб»	Добавлен материал для исследования, актуализированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.8 от 21.02.2022	п. 5.2. Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.9 от 29.08.2022	п. 5.2. Подготовка исследуемых проб для выделения ДНК/РНК:	Добавлены ФТА-карты в качестве исследуемого материала

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений

Программу для KingFisher Flex можно скачать:



Или по ссылке: <http://vetfaktor.ru/upload/flex-faktor.bdz>

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ДНК/РНК-М-FLEX-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