



ИНСТРУКЦИЯ
по применению набора реагентов
для экстракции (выделения) ДНК из биологического материала,
для последующего проведения полимеразной цепной реакции
(ПЦР)
«ДНК-С-ФАКТОР»

ТУ 21.10.60-316-51062356-2022

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	5
4.1 Для зоны выделения ДНК из биологического материала	5
5. Взятие материала. Транспортирование и хранение проб	6
6. Экстракция ДНК из исследуемых образцов	9
7. Условия хранения и транспортировки	10
8. Срок годности	10
Приложение 1. Лист вносимых изменений	10

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.

Набор реагентов предназначен для экстракции (выделения) ДНК из биологического материала, для последующего проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Характеристика набора реагентов.

2.1 Принципы действия.

Биологический образец обрабатывается лизирующим раствором на основе солей гуанидина. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение НК. ДНК в присутствии хаотропного агента связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизата остаются в растворе и удаляются после отмывки осажденного центрифугированием сорбента. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности сорбента в раствор, который отделяется от частиц сорбента центрифугированием. В результате получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов ПЦР.

2.2. Состав набора реагентов.

Набор реагентов рассчитан для экстракции ДНК и выпускается в двух вариантах:

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

Состав набора реагентов приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора реагентов.

№	Компоненты набора реагентов	Описание	Объем, мл		Кол-во
			на 55 реакций	на 110 реакций	
1	Лизирующий раствор	прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость	30	60	1
2	Раствор для отмывки №1	прозрачная бесцветная жидкость	20	35	1
3	Раствор для отмывки №2	прозрачная бесцветная жидкость	60	120	1
4	Сорбент универсальный	суспензия серо-коричневого цвета	2,6	5,2	1
5	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 (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 биологического 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;
- набор для выделения ДНК.

5. Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб.

При отборе образцов материала, 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 отбирают отдельными инструментами.

Материал для исследования:

- 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, 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, 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 и изделия животного происхождения (куски мяса, фарш, мясные полуфабрикаты, желатин 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. Экстракция НК из такого материала, как колбасы, кормовые/пищевые добавки (напр., мясокостная мука) рекомендуется проводить с использованием набора реагентов «ДНК-ПЛАНТ-ФАКТОР», однако при необходимости допускается использование набора «ДНК-С-ФАКТОР».

- Культуры микроорганизмов, питательные среды, бактериальные колонии;

- 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.

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 гигром, 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 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.

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.

- 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.

- 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. Из образцов мясокостной муки готовят 10% суспензию. 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 FTA-картах разрезают на небольшие кусочки (примерно 3х3 мм), помещают в пробирку с 500 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), 40 мкл ресуспендированного сорбента универсального и продолжают выделение НК с пункта 3 (прогревание проб с лизирующим, сорбентом и ВКО).

6. Экстракция ДНК из исследуемых образцов.

Объем исследуемого материала для экстракции ДНК – 100 мкл.

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 500 мкл лизирующего раствора.

2. В пробирку ВК- внести 100 мкл ОКО³ (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 ОКО²**. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 40 мкл ресуспендированного сорбента универсального.

3. 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).

4. Осадить сорбент центрифугированием пробирок при 12000 об./мин⁴ («MiniSpin», Eppendorf) в течение 30 сек. Удалить жидкость с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя, используя сменные наконечники.

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

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

5. Добавить к осажденному сорбенту 300 мкл раствора для отмывки №1, перемешать пипеткой или на вортексе до полного ресуспендирования сорбента (до получения однородного раствора). Осадить сорбент центрифугированием при 12 000 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 30 сек. Удалить жидкость с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя, используя сменные наконечники.

6. Добавить к осадку 500 мкл раствора для отмывки №2, перемешать на вортексе до получения однородной суспензии. Осадить сорбент центрифугированием при 12000 об./мин («MiniSpin», Eppendorf) в течение 30 сек. Удалить жидкость с помощью пипетки или вакуумного отсасывателя, используя сменные наконечники.

7. Повторить пункт 6. Тщательно, не захватывая сорбент, удалить жидкость полностью.

8. Поместить пробирки в термостат при температуре 65°C на 5-10 минут для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты. Убедиться в отсутствии остатков жидкости на стенках пробирок и в осадке.

9. Добавить в пробирки по 100 мкл буфера для элюции ДНК (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.

10. 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-С-ФАКТОР» можно транспортировать всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 25°C.

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

8. Срок годности.

Срок годности набора реагентов «ДНК-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 25.11.19	Стр. 6-8 п. 5 «Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб»	Добавлена пробоподготовка проб продуктов животного происхождения. Изменения по тексту.
Версия 1.2 от 12.02.2021	Таблица 1 «Состав набора»	Изменен суммарный объем отмывки №1 и буфера для элюции ДНК/РНК
Версия 1.3 от 28.05.2021	стр. 8	Добавлена сноска, поясняющая, что вместо ОКО допускается использовать физраствор, ТЕ-буфер, дистиллированную воду
Версия 1.4 от 30.11.2021	п. 5. Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб	Добавлен материал для исследования, актуализирована рекомендуемая пробоподготовка
Версия 1.5 от 21.02.2022	п. 5. Взятие материала. Транспортирование и хранение проб	Отредактированы рекомендации по пробоподготовке
Версия 1.6 от 29.08.2022	п. 5. Взятие биологического материала. Транспортирование и хранение проб.	Добавлены FTA-карты в качестве исследуемого материала

По вопросам качества набора реагентов или по вопросам приобретения «ДНК-С-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