



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ТестГен»
А. Н. Тороповский
«29» декабря 2016 г



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови (ДНК-Плазма-М) по ТУ 9398-002-97638376-2015 в исполнениях:

- 1) «ДНК-Плазма-М-50» на 50 выделений,
- 2) «ДНК-Плазма-М-100» на 100 выделений

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ.....	3
2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА.....	4
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.....	5
4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.....	5
5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	7
6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ	7
7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	8
8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	9
9. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ	12
10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.....	12
11. УТИЛИЗАЦИЯ	13
12. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА, КОНТАКТЫ.....	13

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение: Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из плазмы крови (ДНК-Плазма-М) по ТУ 9398-002-97638376-2015 в исполнениях: 1) «ДНК-Плазма-М-50» на 50 выделений, 2) «ДНК-Плазма-М-100» на 100 выделений предназначен для выделения свободных циркулирующих нуклеиновых кислот из плазмы крови в целях их подготовки к последующему анализу.

Набор реагентов обеспечивает выделение ДНК методом, основанном на обратимом связывании нуклеиновых кислот на поверхности магнитных частиц.

Клиническая значимость набора реагентов состоит в обеспечении преаналитической стадии анализа нуклеиновых кислот (НК), свободно циркулирующих в крови. Получение очищенных препаратов свободно циркулирующих НК из крови позволяет использовать неинвазивные методы анализа в клинической лабораторной диагностике.

Область применения набора реагентов – онкология, пренатальная диагностика.

Материалом для проведения процедуры выделения нуклеиновых кислот служит цельная (свежая или замороженная) плазма крови.

Принцип метода

Большая часть ДНК и РНК в организме содержится внутри клеток. Но небольшое количество нуклеиновых кислот обнаруживается свободно циркулирующим в крови. Эти молекулы ДНК и РНК образуются из мёртвых клеток, содержимое которых выбрасывается в кровоток. Наличие таких свободно циркулирующих ДНК и РНК позволяет использовать малоинвазивные методы диагностики для выявления ряда клинических заболеваний и нарушений. Обнаружение специфических ДНК и/или РНК создаёт уникальный потенциал для ранней диагностики различных патологий. Так можно обнаружить рак на ранних стадиях, многие вирусные инфекции, проводить неинвазивную пренатальную диагностику в период беременности, выявлять некоторые формы диабета.

Показания к применению. Набор реагентов «ДНК-Плазма-М» рекомендуется использовать для проведения анализов в клинической лабораторной диагностике, таких как определение пола плода, выявление носительства генов, ассоциированных с врожденной патологией плода, хромосомных патологий при анализе ДНК, выделенной из крови матери, для проведения анализов на наличие мутаций в циркулирующей ДНК, а также выявления вирусных нуклеиновых кислот в плазме крови человека.

Набор предназначен для профессионального применения в медицинских учреждениях и клинико-диагностических лабораториях.

Общее время проведения процедуры выделения ДНК из 1 образца составляет 90 минут.

Протокол выделения можно модифицировать для масштабирования в случае, когда требуется получение большего количества конечного материала. Для масштабирования необходимо пропорционально изменить объемы используемых реактивов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Набор реагентов «ДНК-Плазма-М» выпускается в двух вариантах исполнения:

- 1) «ДНК-Плазма-М-50» на 50 выделений,
- 2) «ДНК-Плазма-М-100» на 100 выделений.

Наборы реагентов на 50 и 100 выделений включают:

Наименование реагента	Описание	Количество	
		«ДНК-Плазма-М-50»	«ДНК-Плазма-М-100»
Буфер для связывания ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 90 мл	2 флакона по 90 мл
Протеиназа К	Белый порошок	1 флакон 50 мг	1 флакон 100 мг
Раствор для разведения протеиназы К	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 2,5 мл	1 флакон 5 мл
Магнитные частицы, МЧ	Коричневая жидкость	1 пробирка 1,2 мл	2 пробирки по 1,2 мл
Раствор для промывки №1	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 30 мл	1 флакон 60 мл
Раствор для промывки №2	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 15 мл	2 флакона по 15 мл
Элюент	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон 5 мл	1 флакон 10 мл

В наборе для выделения не используются калибраторы и контрольные материалы.

Примечание: изделие не содержит другие ингредиенты, которые могут оказать влияние на проведение процедуры.

ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Принцип используемого в наборе метода основан на обратимом связывании ДНК на поверхности магнитных частиц. После лизирования образца, содержащиеся в нём нуклеиновые кислоты связываются с магнитными частицами. Затем они должны быть отмыты буферами из набора. После нескольких циклов отмытки осадок магнитных частиц должен быть высушен, после чего можно элюировать нуклеиновые кислоты.

Ограничения метода:

В случае, если целью выделения был анализ фетальной ДНК, присутствующей в крови матери, предъявляются повышенные требования к процедуре взятия, хранения крови, получения и хранения плазмы. Недостовверные результаты могут получиться при разрушении клеток крови и освобождении внутриклеточной ДНК.

- Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с EDTA или CPDA. При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в течение 2 суток без заморозки. При использовании EDTA следует отделить плазму в течение 3-4 часов с момента взятия крови.

- Не допускается замораживание крови до процедуры получения плазмы.

- Не допускается работа с гемолизированной и хилезной кровью, при постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты.

- При получении плазмы не допускается её контаминация клетками крови.

- Допускается только однократное замораживание-оттаивание полученной плазмы.

- После окончания процедуры выделения ДНК следует сразу преступать к проведению ПЦР-реакции. Фетальная ДНК присутствует в крови матери в очень низких концентрациях и в деградированном состоянии, в процессе хранения фетальная ДНК может разрушиться, что приведет к ложноотрицательным результатам.

- Ошибки оператора при взятии крови, получении плазмы и в ходе процедуры выделения ДНК, нарушение рекомендованной инструкции может привести к получению недостоверных результатов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Эффективность выделения ДНК, %, не менее	20
Чистота выделения ДНК, A260/280, не менее	1,6

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала, с соблюдением санитарно-эпидемических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». При работе всегда следует выполнять следующие требования:

- Следует рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Выделения, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реактивы в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реактивы, реактивы с истекшим сроком годности, а также использованные реактивы следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром. Одноразовую пластиковую посуду 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 мин.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.

- Допускать к работе с набором только специально обученный персонал.

- Не использовать набор по истечению срока годности.

- Использовать одноразовые перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реактивами. Тщательно мыть руки по окончании работы.

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

- Необходимых мер предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения не предусмотрено.

- В составе набора отсутствуют вещества человеческого или животного происхождения, обладающие потенциальной инфекционной природой, поэтому меры предосторожности против любых специальных, несвойственных рисков при использовании или реализации изделия не предусмотрены. Однако при работе с образцами биологического материала необходимо руководствоваться санитарно-эпидемическими правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Оборудование:

- Стерильный ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия)
- Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия)
- Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия)
- Магнитный штатив для пробирок типа «Эппендорф» на 1,5 -2 мл
- Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия)
- Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия)
- Холодильник от 2°С до 8°С
- Морозильная камера от - 2°С до - 40°С.

Материалы и реагенты, не входящие в состав изделия:

- Чистый этиловый спирт (95%)
- Одноразовые полипропиленовые заворачивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки на 1,5 мл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
- Штативы для микропробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, «Ахуген», США)
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
- Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема 100 мкл и 1000 мкл, свободные от посторонней ДНК и ДНКаз (например, «Ахуген», США)
- Одноразовые или отдельные халаты и одноразовые перчатки
- Емкости с дезинфицирующим раствором

Использование других материалов и реагентов, не входящие в состав изделия, не предусмотрено.

Измерительное оборудование при эксплуатации набора не требуется.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2012г.

Материалом для исследования служит цельная (свежая или замороженная) плазма крови.

Процедура получения биологического материала.

Отбор проб.

Для получения плазмы кровь отбирают в пробирку с EDTA или CPDA.

Закрытую пробирку с кровью несколько раз переворачивают.

При использовании пробирок с CPDA в качестве антикоагулянта допускается транспортировка цельной крови в течение 2 суток без заморозки. При использовании EDTA следует отделить плазму в течение 3-4 часов с момента взятия крови.

Пробоподготовка.

Пробирку с кровью центрифугировать 10-15 мин при 2000-3000g, после чего аккуратно отобрать верхний слой плазмы и перенести его в отдельную одноразовую пробирку, избегая попадания в отбираемый материал сгустков лейкоцитов и слоев с эритроцитами. Плазму центрифугировать 15 минут при 13000g или 10 минут при 16000g, вновь отобрать верхний слой в отдельную пробирку, не затрагивая осадка на дне пробирки. Полученную плазму можно использовать для выделения.

Выделять ДНК следует не менее чем из 1 мл плазмы и растворять в конечном объеме 50-80 мкл (конечный объем должен быть минимально необходимым для однократного анализа - при этом получается самая высокая концентрация ДНК).

При использовании EDTA образец плазмы должен доставляться в лабораторию в течение 16-24 ч после взятия материала (рекомендуется максимально ускорять доставку и осуществлять ее на льду или в термоконтейнерах при температуре - 20°C).

Условия хранения плазмы:

- при температуре не выше 2-8 °C – в течение 5 суток;
- при температуре не выше минус 20°C – в течение месяца;
- при температуре минус 70 °C – длительно.

ВНИМАНИЕ! Допускается только однократное замораживание-оттаивание материала.

ВНИМАНИЕ! Не брать в работу гемолизированную и хилезную кровь. При постановке анализа таких образцов могут получиться недостоверные результаты!

Меры предосторожности при работе с анализируемым материалом – см. раздел 4.

7. ПОДГОТОВКА КОМПОНЕНТОВ НАБОРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

!!!Суспензия магнитных частиц является двухфазной, легко и быстро образует четко разделяемые две фазы. Перед началом работы и перед каждой манипуляцией с раствором магнитных частиц полностью ресуспендировать раствор магнитных частиц на вортексе или пипетированием.

Расслоение или выпадение осадка не влияет на качество растворов. Если образовался осадок или расслоение компонентов одного из флаконов, необходимо прогреть их при 50 °C в течении 3 минут и тщательно перемешать до полного растворения осадка и гомогенизации растворов.

Все компоненты набора перед началом работы необходимо тщательно перемешать.

Перед началом работы следует приготовить **«РАСТВОР ПРОТЕИНАЗЫ К»**. Перенести весь объем «Раствора для разведения протеиназы К» во флакон с сухой «Протеиназой К» и полностью растворить «Протеиназу К».

Перед началом работы следует приготовить **«ПРОМЫВОЧНЫЙ РАСТВОР №1»**. Добавить **15 мл этилового спирта (95%) к «Раствору для промывки №1»** для набора «ДНК-Плазма-М-50» или **30 мл этилового спирта (95%)** для набора «ДНК-Плазма-М-100».

Перед началом работы следует приготовить **«ПРОМЫВОЧНЫЙ РАСТВОР №2»**. Добавить по **60 мл этилового спирта (95%) в каждый флакон «Раствора для промывки №2»**.

8. ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

К работе с набором допускается только специально обученный персонал с навыками проведения ПЦР-анализов.

На Рисунке 1 схематически представлена процедура выделения.

Выделение ДНК проводится из **1000 мкл образца плазмы**.

Для каждого образца подготовить **по 4 пробирки на 1.5 или 2 мл**.

Подписать пробирки соответственно образцам.

1. Внести **по 500 мкл образца** в две 1.5 или 2 мл пробирки.

2. В каждую пробирку внести по **500 мкл буфера для связывания ДНК** и по **25 мкл раствора протеиназы К**, тщательно перемешать на вортексе.

3. Инкубировать пробирки **при 60°C в течение 15 минут**, перемешивать во время инкубирования 2-3 раза на вортексе.

4. После инкубирования смешать в отдельной пробирке **500 мкл** хорошо перемешанного **буфера для связывания ДНК** и **20 мкл** предварительно тщательно перемешанного **раствора магнитных частиц**. Тщательно размешать частицы в буфере пипетированием.

5. Внести **по 260 мкл** подготовленной **суспензии магнитных частиц в буфере для связывания** в каждую пробирку с образцами. Тщательно перемешать пипетированием.

6. Инкубировать **при комнатной температуре в течение 5 минут**, перемешивать во время инкубирования 2-3 раза на вортексе.

7. Поместить пробирки в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирок (обычно требуется 1-2 минуты) и **удалить супернатант**.

8. Внести в одну из двух пробирок, относящихся к единому образцу, **700 мкл** хорошо перемешанного **промывочного раствора №1**, полностью ресуспендировать магнитные частицы в растворе, **перенести получившуюся суспензию магнитных частиц и промывочного раствора №1 во вторую пробирку** с осадком магнитных частиц, относящихся к этому же образцу. Тщательно ресуспендировать магнитные частицы пипетированием.

9. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалить супернатант.

10. Внести в пробирку **700 мкл** хорошо перемешанного промывочного раствора №2, тщательно перемешать на вортексе.

11. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки и удалить супернатант.

12. Повторить пункты 10 и 11.

13. Поместить пробирки с приоткрытыми крышками в термостат и инкубировать при 60 °C в течение 10 минут для просушки и удаления остаточного этилового спирта (95%).

14. Внести в пробирку **60 мкл буфера для элюирования**. Тщательно ресуспендировать частицы при помощи вортекса.

15. Инкубировать при 60 °C в течение 10 минут, во время инкубирования перемешать 2-3 раза на вортексе.

16. Поместить пробирку в магнитный штатив, подождать, пока частицы полностью соберутся на стенке пробирки.

17. Перенести супернатант, содержащий выделенную ДНК, в новую пробирку.
ВНИМАНИЕ! Отбор очищенной ДНК осуществляется без снятия пробирок с магнитного штатива.

ВНИМАНИЕ! В случае, если целью выделения был анализ фетальной ДНК, присутствующей в крови матери, следует сразу после окончания процедуры выделения приступать к проведению ПЦР-реакции. Фетальная ДНК присутствует в крови матери в очень низких концентрациях и в деградированном состоянии, в процессе хранения фетальная ДНК может разрушиться, что приведет к ложноотрицательным результатам.

При необходимости полученную ДНК можно хранить:

- при +4 °C – не более суток,
- при минус 20 – минус 40°C – не более месяца,
- при минус 86 °C – длительно.

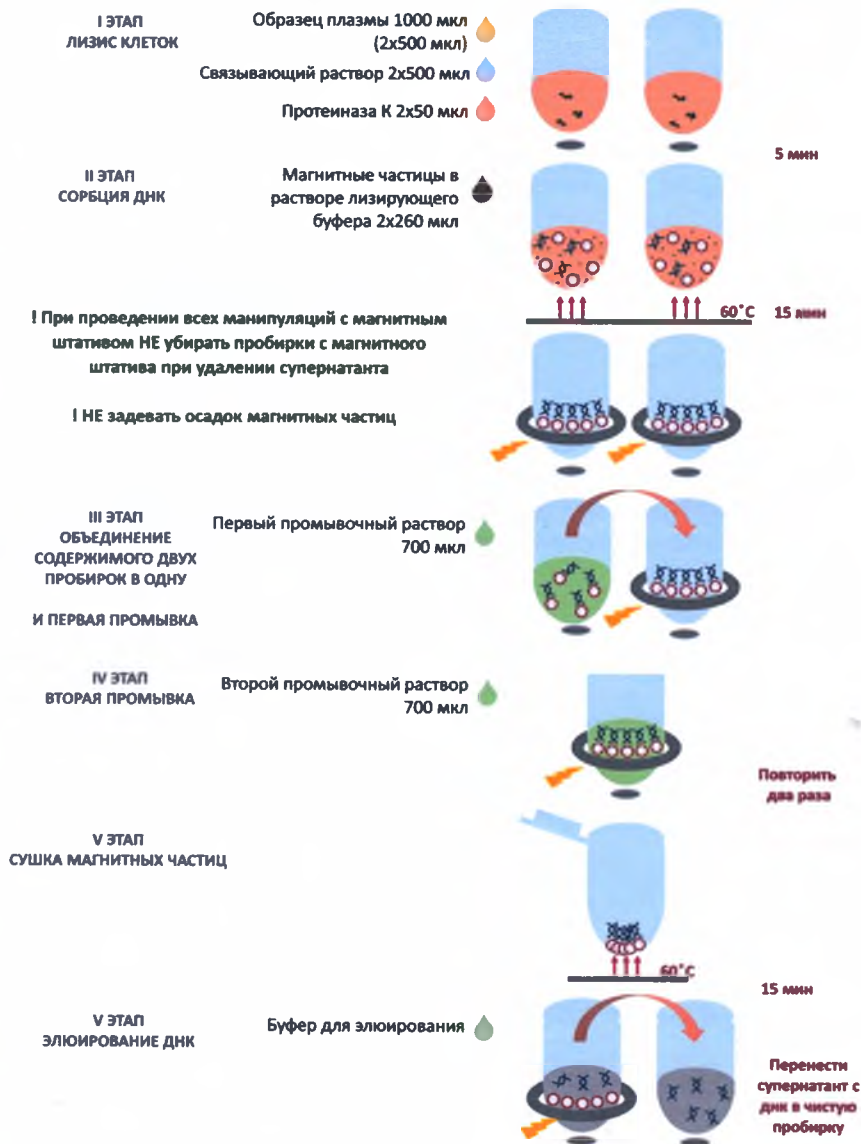


Рисунок 1. Схема процедуры выделения.

9. ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ИХ РЕШЕНИЕ

1. Низкий выход ДНК, причина и возможное решение:

- состояние образца (в образце содержится недостаточное количество ДНК, образец долго хранился, или неправильно хранился, или несколько раз подвергался процедуре замораживания-оттаивания) – возможные решения: брать больше исходного материала или проводить элюцию в меньшее количество буфера; повторить сбор материала;
- неполное высушивание частиц перед добавлением элюирующего буфера – увеличить время сушки после удаления промывочного раствора №2;
- неполный лизис – после внесения буфера для связывания как можно тщательнее суспендировать образец;
- большой объем буфера для элюирования – подберите оптимальный объем буфера для получения нужной концентрации ДНК.

2. **Примеси белка** – нужно добиваться максимально тщательного суспендирования магнитных частиц.

3. **Возможная деградация ДНК**, причина и возможное решение – старый образец, либо образец подвергался замораживанию-оттаиванию – необходимо провести сбор материала повторно. Избегать замораживания образца в процессе транспортировки и хранения.

Если у Вас есть вопросы или Вы нуждаетесь в консультации, обратитесь в службу поддержки компании «ТестГен» - см. раздел 12.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Хранение. Набор реагентов хранить при температуре не выше +30°C и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Протеиназу К следует хранить при температуре минус 20°C.

Срок годности вскрытых компонентов набора – 12 месяцев при условии хранения при температуре не выше +25°C.

После вскрытия флаконов и добавления этилового спирта (95%) и «Промывочным раствором №1 и №2» срок годности 6 мес.

После разведения раствор протеиназы К следует хранить не более 6 мес. при температуре ниже минус 18°C.

Набор реагентов, хранившийся с нарушением регламентированного режима применения не подлежит.

Транспортировка. Набор реагентов транспортировать при температуре не выше +30 °C, и относительной влажности воздуха до 90%. Атмосферное давление не контролируется, т.к. не влияет на качество изделия.

Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима применению не подлежат.

Срок годности. 12 мес. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

11. УТИЛИЗАЦИЯ

Наборы реагентов, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Допускается дальнейшее использование компонентов изделия (при сохранении ими эксплуатационных свойств), входящих в состав комплекта, признанного непригодным для применения, в пределах срока их годности.

Жидкие компоненты (реагенты, реактивы) уничтожаются сливом в канализацию с предварительным разбавлением реагента водопроводной водой 1:100 и вывозом остатка упаковок как производственный или бытовой мусор.

Потребительская упаковка набора реагентов «ДНК-Плазма-М» подлежит механическому разрушению с вывозом остатков как производственного или бытового мусора.

Персонал, осуществляющий уничтожение набора реагентов, должен соблюдать правила безопасности проведения того или иного способа уничтожения.

12. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА, КОНТАКТЫ

Производитель гарантирует стабильную работу наборов при соблюдении условий хранения в течение срока годности.

При возникновении претензий по качеству наборов, обращаться по адресу:

Общество с Ограниченной Ответственностью «ТестГен» (ООО «ТестГен»),

432072 г. Ульяновск, Инженерный 44-й проезд, дом 9

Тел.: +7 499 705-03-75

www.testgen.ru

Руководитель технической поддержки:

Сорокоходов Лев Сергеевич

Тел.: +7 927 981 58 81

Тел.: +7 927 737 83 40

E-mail: support@testgen.ru



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью

13 (тринадцать) листов

Должность: ген. директор

Тороповский А.Н.