

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
Общества с ограниченной
ответственностью «НекстБио»

Е. А. Агафонова
« 30 »  2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для экстракции ДНК из клинического материала
«АмплиПрайм ДНК-сорб-В»

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ3

НАЗНАЧЕНИЕ.....3

ПРИНЦИП МЕТОДА3

ФОРМЫ ВЫПУСКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ3

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ4

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ5

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА ..6

СОСТАВ6

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ6

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ8

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....9

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

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
ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора	– Федеральное государственное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов предназначен для экстракции (выделения) ДНК из клинического материала.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Клинический образец, обрабатывается лизирующим раствором в присутствие частиц силики - сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствие лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного клинического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При добавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием. В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

ФОРМЫ ВЫПУСКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ

Комплект реагентов выпускается в 2 формах комплектации:

Форма 1 включает **вариант 50** – комплект реагентов для экстракции ДНК из 50 проб, включая контроли;

Форма 2 включает **вариант 100** – комплект реагентов для экстракции ДНК из 100 проб, включая контроли.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, 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 односторонним. 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 (пробирки, 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 мин.

- Применять набор строго по назначению, согласно данной инструкции.
- Допускать к работе с набором 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.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Стерильный ламинарный бокс (например, «БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», «Ламинарные системы», Россия).
2. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °C (например, «ТЕРМО 24-15», «Биоком», Россия).
3. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1», г. Ульяновск, Россия).
4. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 16 тыс. об/мин (например, MiniSpin, Eppendorf, Германия).
5. Вортекс (например, «ТЭТА-2», «Биоком», Россия).
6. Отдельный набор автоматических дозаторов переменного объема (например, «Ленпипет», Россия).
7. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки на 1,5 мл (например, Axygen, США).
8. Штативы для пробирок на 1,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия) и наконечников (например, Axygen, США).
9. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
10. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axygen, США).
11. Холодильник от 2 до 8 °C с морозильной камерой не выше минус 16 °C.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Емкость для сброса наконечников.

40

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Перед началом работы следует ознакомиться с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, 2008 г.

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» вариант 50 или вариант 100 – комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала – включает:

Реактив	Описание	Вариант 50		Вариант 100	
		Объем, мл	Кол-во	Объем, мл	Кол-во
Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для отмывки 1	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1 флакон	30	1 флакон
Раствор для отмывки 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1 флакон	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,25	1 пробирка	1,25	2 пробирки
ТЕ-буфер для элюции ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	1 пробирка	5,0	2 пробирки

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Порядок работы

Объем исследуемого материала для экстракции ДНК - 0,1 мл.

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО (если он предусмотрен для анализа данного возбудителя инфекции) и по 300 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с лизирующим раствором и ВКО (если используется) внести по 100 мкл проб, используя наконечники с фильтром. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести 100 мкл ОКО. В пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести 90 мкл ОКО и 10 мкл ПКО (если он предусмотрен для анализа).
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин при температуре 65 °С (если Вы работаете с плазмой крови, прогревать пробу не нужно).

Процентрифугировать 5 с при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин при 12 тыс об/мин и использовать для выделения ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку.

5. Тщательно ресуспендировать **сорбент универсальный** на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по **25 мкл** ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин, еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс об/мин в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по **300 мкл раствора для отмывки 1**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального. Осадить сорбент универсальный центрифугированием при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Добавить в пробы по **500 мкл раствора для отмывки 2**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать 30 с при 10 тыс об/мин на микроцентрифуге. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы.
9. Повторить процедуру отмывки, следуя пункту 8, удалить надосадочную жидкость полностью.
10. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 °C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.
11. В пробирки добавить по **50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК**. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65 °C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе.
12. Процентрифугировать пробирки при 12 тыс об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенную ДНК можно хранить в течение 1 нед. при температуре от 2 до 8 °C, и в течение года при температуре не выше минус 16 °C.

Эффективность экстракции ДНК составляет 50 – 70%.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

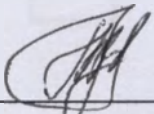
Срок годности. 12 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 25 °С не более 5 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 25 °С.

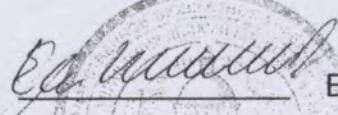
Рекламации на качество комплекта реагентов **«АмплиПрайм ДНК-сорб-В»** направлять на адрес предприятия-изготовителя ООО «НекстБио» (111141 г. Москва, 3-й проезд Перова поля, 8 стр.1) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 768-71-81, e-mail: info@nextbio.ru).

Старший технолог производства


(подпись)

В. В. Петров

Главный врач ФГБУ «Поликлиника №1»
Управления делами Президента
Российской Федерации


(подпись, печать)

Е. Л. Никонов

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ



Номер в каталоге



Осторожно!
Обратитесь к
сопроводительной
документации



Код партии



Максимальное
число тестов



Изделие для in vitro
диагностики



Использовать до



Дата изменения



Обратитесь к
руководству по
эксплуатации



Ограничение
температуры



Не допускать
попадания
солнечного света



Верхнее ограничение
температуры



Дата изготовления



Производитель

Пронумеровано, прошнуровано и скреплено
печатью 9 листа 28

Генеральный директор ООО «НекстБио»



Е. А. Агафонова