



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот

GXT DNA/RNA Extraction Kit,

производства Hain Lifescience GmbH, Германия

(применяется при работе с прибором для выделения нуклеиновых кислот
GenoXtract)

2011

Содержание

1. Общая информация и назначение	3
2. Характеристики набора реагентов	3
3. Меры предосторожности	4
4. Оборудование и материалы	4
5. Образцы	4
6. Проведение выделения НК	4
7. Результаты выделения НК	6
8. Условия хранения	6

1. Общая информация и назначение

Набор реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit, производства Hain Lifescience, Германия, позволяет выделить нуклеиновые кислоты (НК) из различных образцов на приборе GenoXtract, Hain Lifescience, Германия, в автоматическом режиме.

2. Характеристики набора реагентов

Методика выделения с помощью магнитных частиц обеспечивает высокую степень очистки НК. Использование одноразовых расходных материалов (картриджей, помпы, пипетки), поставляемых в наборе реагентов обеспечивает минимальный риск контаминации прибора GenoXtract. В качестве образцов возможно использование легочного и внелегочного материала (кроме крови), культуру клеток. Время выделения ДНК/РНК $\approx$ 42 мин.

В результате испытаний установлено что НК, выделенные с помощью набора GXT DNA/RNA Extraction kit подходят для дальнейшего анализа с помощью наборов GenoType MTBDR plus, GenoType MTBDR sl, GenoType Mycobacteria Direct GXT, GenoQuick MTB. Набор GXT DNA/RNA Extraction kit может использоваться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами.

Правильное взятие материала от пациента и подготовка образца является залогом успешного выделения НК.

Выделение ДНК/РНК включает этапы:

1. Бактерии, которые присутствуют в образце специфично связываются с магнитными частицами. Во время магнитной сепарации супернатант удаляется. Таким образом, связавшаяся бактерия свободна от ингибиторов, поэтому выделенные НК отличаются чистотой.
2. При последующем лизисе НК на поверхности магнитных частиц.
3. При последующей магнитной сепарации остатки клеток удаляются из раствора без каких-либо потерь для НК.
4. Комплекс НК - магнитная частица далее отмывается, и НК переносятся в чистую пробирку.
5. В результате Вы получаете высококачественные НК, которые можно использовать в различных тест-системах, предназначенных для работы с ДНК или РНК.

Состав набора реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit

В состав набора реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit входят картриджи, представляющие собой пластиковые емкости, разбитые на ячейки. Часть ячеек пустые для выполнения в них отдельных этапов, другая часть содержат реагенты для проведения выделения НК.

1. Картриджи с реагентами (Reagent cartridges), 96 шт.:

Ячейка 1 – пустая (empty).

Ячейка 2 - Элюентный буфер (Elution buffer), 500 мкл.

Ячейка 3 – Вода (Water), 2500 мкл.

Ячейка 4 – Вода (Water), 2500 мкл.

Ячейка 5 - Этанол с концентрацией 70% (70% Ethanol), 1200 мкл.

Ячейка 6 - Захватывающий буфер (Capture buffer), 300 мкл.

Ячейка 7 - Раствор с магнитными частицами (Magnetic bead solution), 200 мкл.

Ячейка 8,9,10 – пустые (empty).

Ячейка 11 - Этанол с концентрацией 96% (96% Ethanol), 800 мкл.

Ячейка 12 - Лизирующий буфер (Lysis buffer), 350 мкл.

2. Одноразовые наконечники (Disposable tips), 96 шт.

3. Одноразовые помпы (Disposable pumps), 98 шт.

3. Меры предосторожности

При работе с набором реагентов необходимо обращать внимание, что в его составе есть компоненты, которые не должны контактировать с сильными кислотами, щелочами, окислителями и др. Образцы от пациентов и культуры, полученные из образцов пациентов, всегда должны рассматриваться, как потенциально инфекционные. Образцы от пациентов из группы риска и культуры, полученные из этих образцов, всегда должны быть промаркированы, и работать с ними необходимо, соблюдая все меры предосторожности. Необходимо соблюдать федеральные, государственные и местные законы безопасности труда и охраны окружающей среды. Всегда использовать защитную одежду и перчатки.

Обработку образцов и пробоподготовку, включая инактивацию при высокой температуре, надо проводить в ламинарном боксе II класса. Перед инактивацией при высокой температуре, пробы нужно центрифугировать с применением аэрозоль-непроницаемого ротора. Аэрозоль-непроницаемый ротор можно открывать исключительно в ламинарном боксе. После инактивации при высокой температуре может быть применен стандартный ротор для центрифугирования проб вне ламинарного бокса.

4. Оборудование и материалы

Для выделения нуклеиновых кислот набор реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit используют при работе прибора GenoXtract, производства Hain Lifescience, Германия. Максимальная производительность прибора за одну постановку - 12 образцов, минимальная – 1 образец.

Необходимые материалы, не входящие в набор реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit

1. 1,5 мл пробирки с закручивающимися крышками для НК;
2. 1,5 мл/2 мл пробирки с закручивающимися крышками для образцов;
3. Механические дозаторы на 10, 20, 200, 1000 мкл;
4. Перчатки;
5. Стерильные наконечники с фильтром;
6. Прибор для выделения НК GenoXtract;
7. Водяная баня (шаг температуры +/- 1°C) ;
8. Вода для молекулярных исследований.

5. Образцы

В качестве образцов возможно использование легочного и внелегочного материала (кроме крови), культуру клеток.

Образцы (деконтаминированный легочный и внелегочный материал, кроме крови) до деконтаминации должны храниться в стерильных пробирках при 2-8°C не более 3-х дней.

После деконтаминации клетки должны быть ресуспендированы в 1-1,5 мл фосфатного буфера (большее количество буфера может снизить чувствительность теста).

Деконтаминированные образцы могут храниться до 1-й недели при -20°C.

6. Проведение выделения НК

Рабочая область должны быть свободны от ДНК и РНК.

Для проверки контаминации во время выделения НК можно использовать контроль. Для этого вместо одного образца необходимо использовать пробирку с водой.

Для набора GenoType Mycobacteria Direct GXT позитивный контроль РНК (PC RNA) поставляется в наборе GenoType Mycobacteria Direct GXT. Для наборов GenoType MTBDR plus, GenoType MTBDR sl, GenoQuick MTB в качестве позитивного контроля можно использовать культуру комплекса *M.tuberculosis* (не поставляется в наборах). При необходимости используйте позитивный контроль при каждом выделении НК.

Приготовление позитивного контроля при работе с набором GenoType Mycobacteria Direct GXT:

1. Добавьте 15 мкл Control RNA Buffer (CRB) к лиофилизату PC-RNA (этого количества достаточно для трех выделений НК) и перемешайте на вортексе. В наборе GenoType Mycobacteria Direct GXT поставляется две пробирки лиофилизата PC-RNA.
2. Для приготовления позитивного контроля смешайте 5 мкл растворенного PC-RNA и 700 мкл воды в пробирки на 1,5 мл с закручивающейся крышкой. После этого пробирка с позитивным контролем используется как пробирка с образцом.

Приготовление позитивного контроля при работе с наборами GenoType MTBDR plus, GenoType MTBDR sl, GenoQuick MTB:

1. Используйте на растворенную культуру комплекса *M.tuberculosis* (наборы GenoType MTBDR plus, GenoType MTBDR sl) или растворенную культуру комплекса *M.tuberculosis* с водой в соотношении 1:10 (GenoQuick MTB).
2. Для приготовления позитивного контроля смешайте 10 мкл растворенной или нерастворенной культуры и 700 мкл воды в пробирки на 1,5 мл с закручивающейся крышкой. После этого пробирка с позитивным контролем используется как пробирка с образцом.

Подготовка образца:

1. Используя механический дозатор, осторожно перемешайте образец.
2. Переместите 700 мкл образца в 1,5 мл/2 мл пробирку с закручивающейся крышкой.
3. Для инактивации поместите пробирки с образцами в водяную баню на 20 мин. при 80 °C.

Работа с прибором GenoXtract (см. Инструкцию прибора)

1. Приготовьте необходимое количество пипеток.
2. Включите прибор и нажмите «Continue» («Продолжить»). После инициализации нажмите «Start new batch» («Начать новый процесс»).
3. В списке протоколов выбрать протокол «GXT_DNA_RNA_V1».
4. Загрузите необходимое количество картриджей в прибор (сумма количества образцов и контролей).
5. Удалите фольгу с картриджами и подтвердите это нажав «Ок».
6. Загрузите пробирки с образцами в прибор и подтвердите это нажав «Ок».
7. Загрузите пустые с открытыми крышками 1,5 мл пробирки для НК в прибор и подтвердите это нажав «Ок».
8. Загрузите пипетки в прибор и подтвердите это нажав «Ок».
9. Закройте крышку прибора и нажмите «Start» («Старт»).

7. Результаты выделения НК

Если протокол завершился успешно, на экран выводится сообщение, после чего пробирки с выделенными НК, могут быть извлечены из прибора и использованы для дальнейшего анализа.

Выделенные НК могут храниться до 3-х дней при -40 до -80°C.

После завершения работы извлеките из прибора все пробирки, картриджи и пипетки и утилизируйте их соответствующим образом.

8. Условия хранения

Храните все компоненты набора реагентов GXT DNA/RNA Extraction kit при комнатной температуре 15-25 °С. Необходимо избегать заморозки реагентов и попадания под прямые солнечные лучи. При хранении картриджи должны располагаться горизонтально (фольгой вверх).

Генеральный директор

ООО «БиоЛайн»

30 сентября 2011 г.



/ Александр Владимирович Семенов/

М.П.

В настоящем документе прошито и
пронумеровано 6 (шесть) листов
Генеральный директор
ООО «БиоЛайн»

Семенов А.В.

