

«УТВЕРЖДЕНА»

«УТВЕРЖДАЮ»

Приказом Росздравнадзора
от «__» ____ 20__ г. № _____

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
Швырев М.В.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ
СПИРТОВОГО ОСАЖДЕНИЯ
(«Экстра-ДНК-Био»)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Экстра-ДНК-Био» предназначен для быстрого и эффективного выделения ДНК из сыворотки/плазмы крови, цельной крови, сухих пятен крови, слюны, мочи, соскобов эпителиальных клеток со слизистой цервикального канала и уретры с целью последующего исследования молекулярно-биологическими методами, в том числе методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Набор рассчитан на выделение ДНК из 96 образцов.

***Внимание!** В состав наборов ПЦР серии «НК-Детект» входит положительный контрольный образец (ПКО) и внутренний контрольный образец (ВКО), соответствующие анализируемому объекту. ПКО должен проходить процедуру выделения одновременно с биологическими образцами. ВКО добавляется перед началом процедуры выделения во все анализируемые образцы, включая контрольные (ПКО и отрицательный контрольный образец (ОКО)). При использовании нескольких наборов для выявления ДНК использовать контрольные образцы (ПКО, ВКО) с большим порядковым номером серии на флаконе.*

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип действия набора «Экстра-ДНК-Био» состоит в обработке биологического образца лизирующим буфером с последующим спиртовым осаждением, отмывкой и элюцией ДНК.

2.2. Состав набора

Реактив	Объем, мл	Количество
Лизирующий буфер	50	1 флакон
Осадитель ДНК	35	2 флакона
Раствор для отмывки	50	2 флакона
Буфер для растворения ДНК	10	1 флакон
Отрицательный контрольный образец	1,5	1 пробирка

Для выделения ДНК из образцов мочи и слюны необходимо использовать дополнительные реагенты – физиологический раствор (NaCl 0,9 %) и транспортную среду с муколитиком соответственно.

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Потенциальный риск применения набора – класс 1 (по ГОСТ Р 51609-2000).
- 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» 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».
- Обработку клинического материала и выделение ДНК необходимо проводить в зоне выделения нуклеиновых кислот согласно методическим указаниям МУ 1.3.1888-04 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности».
- Удалять неиспользованные реактивы в соответствии с требованиями СП 2.1.7.728-99 «Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений».
- Для выделения ДНК следует иметь два набора пипеток – для работы с клиническими образцами и для внесения растворов.
- Не использовать набор по истечении срока годности.
- Не допускать контакта компонентов набора с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте обильно промыть участок контакта водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- Ламинарный бокс (класс биологической безопасности II тип А);
- термошейкер для пробирок 1,5 мл, поддерживающий температуру +25...+100 °С и скорость вращения 1300 об/мин;

- микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» до 13 тыс об/мин;
- центрифуга/вортекс;
- вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости;
- набор пипеток полуавтоматических одноканальных переменного объема (20-200 мкл; 100-1000 мкл);
- одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл;
- одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 и до 1000 мкл;
- штативы для микропробирок объемом 1,5 мл;
- холодильник от +2...+8 °С с морозильной камерой, поддерживающей температуру -18...-22 °С;
- отдельный халат, шапочка, обувь и одноразовые перчатки.
- емкость с дезинфицирующим средством для сброса наконечников.

5. ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ПРЕДОБРАБОТКА ОБРАЗЦОВ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Процедура взятия клинического материала проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Транспортирование клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом.

Для длительного хранения образцов при температуре -18...-22 °С и ниже желательно аликвотировать порциями 0,1-0,2 мл в отдельные пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Допускается только однократное замораживание-оттаивание образца.

КРОВЬ	
Предобработка проб	Взятие цельной крови проводить в пластиковые пробирки с добавлением в качестве антикоагулянта этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. <i>Внимание! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.</i> Для получения плазмы цельную кровь с антикоагулянтом центрифугировать при 3 тыс. об/мин. в течение 20 минут при +18...+25 °С. Отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

	Для получения сыворотки пробирки с цельной кровью без добавления антикоагулянта отстаивать при комнатной температуре в течение 30 минут до полного образования сгустка. Затем центрифугировать при 3 тыс. об/мин. в течение 10 минут при комнатной температуре. Отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (сыворотка) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
Условия хранения материала	Не допускается замораживание образцов цельной крови! Образцы цельной крови хранить при температуре +2...8 °С – не более 2 суток для проведения количественного анализа и не более 1 месяцев для получения геномной ДНК. Образцы плазмы и сыворотки: • при температуре +2...+8 °С - в течение 5 суток; • при температуре -18...-22 °С - в течение года • при температуре -68...-72 °С - длительно.
СОСКОБЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ УРЕТРЫ И ЦЕРВИКАЛЬНОГО КАНАЛА	
Предобработка проб	Исследуемый материал забирать одноразовыми стерильными зондами в транспортную среду.
Условия хранения материала	При использовании транспортной среды с муколитиком: • при комнатной температуре (+18...+25 °С) – не более 48 часов; • при температуре +2...+8 °С – не более 4 суток; • при температуре -18...-22 °С и ниже – длительно.
МОЧА	
Предобработка проб	Взболтать флакон с мочей. Перенести 1 мл мочи, используя наконечник с фильтром, в стерильные одноразовые микропробирки объемом 1,5 мл. Центрифугировать 5 минут при 13 тыс.об/мин. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удалить супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавить физиологический раствор (NaCl 0,9 %) до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивать содержимое на вортексе.
Условия хранения предварительно обработанных проб	Образцы мочи: • при комнатной температуре +18...+25 °С не более 48 часов; • при температуре +2...+8 °С – в течение двух недель; • при температуре -18...-22 °С – длительно.

СЛЮНА		
Забор материала	полоскание	Полость рта тщательно прополоскать (10-15 секунд) 8-10 мл изотонического раствора хлорида натрия. Жидкость забрать в стерильную центрифужную пробирку 15 мл.
	буккальные мазки	Мазки берут сухими стерильными ватными тампонами вращательными движениями с внутренней поверхности щеки. После забора материала тампон (рабочую часть зонда с ватным тампоном) помещают в стерильную одноразовую пробирку с транспортной средой. Погрузив рабочую часть зонда в транспортную среду, вращают зонд в течение 10-15 секунд, избегая разбрызгивания раствора. Вынимают зонд из раствора, прижимая его к стенке пробирки и, отжав избыток жидкости, удаляют зонд и закрывают пробирку.
Предобработка проб	Биоматериал центрифугируют в течение 3 минут при 3000 об/мин., супернатант отбирают так, чтоб над осадком остался слой водной фракции 0,5 - 1 мл. В пробы вносят 200 мкл транспортной среды с муколитиком, осадок ресуспендируют на вортексе. Полученную суспензию используют для выделения ДНК.	
Условия хранения материала	• при комнатной температуре (+18...+25 °C) - в течение 6 часов; • при температуре +2...+8 °C - в течение 1 недели; • при температуре -18...-22 °C - в течение 1 месяца; • при температуре -68...-72 °C - длительно.	

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Подготовка компонентов набора

Извлечь набор из холодильника, открыть упаковку, извлечь компоненты, лизирующий буфер прогреть при температуре +65 °C до полного растворения кристаллов.

6.2. Постановка анализа

- Отобрать и промаркировать необходимое для работы количество пробирок объемом 1,5 мл (по количеству исследуемых образцов, включая положительные и отрицательные контроли).

- В каждую пробирку внести по 20 мкл раствора ВКО и по 500 мкл лизирующего буфера.

Внимание! ВКО и ПКО необходимо использовать только при выделении ДНК для анализа ПЦР-наборами серии «НК-Детект». Процедура подготовки

контрольных образцов к анализу описана в инструкциях к соответствующим ПЦР-наборам.

6.2.1. Экстракция ДНК из цельной крови

1	В подготовленные пробирки внести по 25 мкл клинического образца. В пробирку маркированную «ОКО» внести 25 мкл ОКО. В пробирку маркированную «ПКО» внести 25 мкл ПКО. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.
2	Инкубировать при +75 °С 15 минут на термошейкере* с частотой вращения 1300 об/мин, сбросить капли раствора со стенок пробирок центрифугированием при 1,5-3 тыс. об/мин. в течение 2-3 секунд.
3	Внести в каждую пробирку по 550 мкл осадителя ДНК, перемешать на вортексе 5-10 секунд.
4	Центрифугировать в течение 5 минут при 13000 об/мин. Супернатант отобрать медицинским отсасывателем.
5	Добавить к осадку 1 мл раствора для отмывки, перемешать на вортексе 5-10 секунд.
6	Центрифугировать в течение 3 минут при 13000 об/мин. Супернатант отобрать медицинским отсасывателем.
7	Выдержать осадки в пробирках с открытыми крышками при комнатной температуре 3-5 минут. Процесс высушивания осадков необходимо контролировать визуально – сухой осадок не блестит. <u>Внимание! Не допускать пересушивания осадка.</u>
8	Добавить к осадку 60 мкл буфера для растворения ДНК, перемешать на вортексе.
9	Инкубировать в термошейкере* при +60 °С в течение 10 минут с частотой вращения 1300 об/мин.
10	Центрифугировать пробирки в течение 1 минуты при 13000 об/мин.
Пробы готовы для проведения ПЦР.	

6.2.2. Экстракция ДНК из пятен крови

1	Диски, вырезанные панчером из центральных областей высушенных пятен крови, поместить в подготовленные пробирки. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.
2	Пробы инкубировать при +75 °С в течение 15 минут на термошейкере с частотой вращения 1300 об/мин. <u>Важно: в процессе инкубации перемешивать на вортексе каждые 2 минуты по 10-15 секунд.</u>
3	Центрифугировать в течение 3 минут при 13000 об/мин.

4	Не затрагивая диски, перенести супернатант в количестве 400 мкл в чистые микропробирки объемом 1,5 мл.
5	Внести осадитель: по 550 мкл в пробирки с ОКО и ПКО, по 400 мкл в пробирки с анализируемыми образцами.
6	Далее следуйте протоколу 6.2.1, начиная с 4 пункта.
Пробы готовы для проведения ПЦР.	

6.2.3. Экстракция ДНК из слюны

1	В подготовленные пробирки внести по 100 мкл клинического образца. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 100 мкл ОКО. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл ПКО и 75 мкл ОКО. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.
2	Инкубировать при +75 °С 15 минут на термошейкере* с частотой вращения 1300 об/мин, сбросить капли раствора со стенок пробирок центрифугированием при 1,5-3 тыс. об/мин. в течение 2-3 секунд.
3	Внести в каждую пробирку по 700 мкл осадителя, перемешать на вортексе 5-10 секунд.
4	Далее следуйте протоколу 6.2.1, начиная с 4 пункта.
Пробы готовы для проведения ПЦР.	

6.2.4. Экстракция ДНК из мазков/соскобов, плазмы/сыворотки

1	В подготовленные пробирки внести по 100 мкл клинического образца. В пробирку, маркированную «ОКО», внести 100 мкл ОКО. В пробирку, маркированную «ПКО», внести 25 мкл ПКО и 75 мкл ОКО. Перемешать на вортексе 3-5 секунд.
2	Инкубировать при +75 °С в течение 15 минут на термошейкере* с частотой вращения 1300 об/мин, сбросить капли раствора со стенок пробирок центрифугированием при 1,5-3 тыс. об/мин. в течение 2-3 секунд.
3	Внести в каждую пробирку по 600 мкл осадителя ДНК, перемешать на вортексе 5-10 секунд.
4	Далее следуйте протоколу 6.2.1, начиная с 4 пункта.
Пробы готовы для проведения ПЦР.	

*при использовании термостата без функции перемешивания необходимо встряхивать содержимое пробирок на вортексе каждые 2 минуты в течение 10-15 секунд.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ НАБОРА

Срок годности набора 12 месяцев со дня выпуска.

Компоненты после вскрытия хранить при + 2...+8 °С в течение всего срока годности набора.

Не допускается смешивание или одновременное использование реагентов из разных серий наборов.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Допускается транспортирование наборов при температуре до + 25 °С не более 7 суток.

8. УСТРАНЕНИЕ ПРОБЛЕМ

Проблема	Возможные причины и пути решения
Мало очищенной ДНК (Наблюдается сдвиг пороговых циклов ВКО более чем на 2 относительно среднего значения ВКО по всей постановке)	• Использован избыточный объем образца. Уменьшите количество исходного образца, не используйте объемы больше тех, которые указаны в протоколах. • Исходный материал не был полностью лизирован. Прогревайте лизирующий буфер перед использованием до растворения осадка. • Осадки не растворились. Не пересушивайте осадки.
ДНК в образце деградировала (не наблюдается аналитического сигнала, при наличии сигнала ВКО)	• Образец был подвергнут неоднократному замораживанию. Избегайте повторения циклов замораживания-оттаивания. Используйте свежий образец для выделения ДНК. • Неблагоприятные условия хранения образца. Храните образцы в тех условиях, которые указаны в протоколах.
Ингибирование реакции (наблюдается сдвиг пороговых циклов ВКО более чем на 2 относительно среднего значения ВКО по всей постановке)	• Очищенная ДНК содержит остатки отмывочного раствора. Высушивание осадков перед растворением ДНК проводите в соответствии с инструкцией.

По вопросам качества набора «Экстра-ДНК-Био» следует обращаться в ООО «Компания Алкор Био» по адресу: 192148, г. Санкт-Петербург, Железнодорожный проспект, д.40, лит.А, тел/факс: (812) 677-87-79.

Генеральный директор
ООО «Компания АлкорБио»



Швырев М.В.

Руководитель ЛМД
ООО «Компания АлкорБио»

Павлов А.Е.

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. кафедрой клинической
лабораторной диагностики ГБОУ ДПО
РМАПО Минздравсоцразвития России

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«дв» 03 2012г.



Прошито, пронумеровано, скреплено
печатью 9 (десять) листов

Генеральный директор
ООО «Компания Алкор Био»
М.В. Швырев

