

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Общества с  
ограниченной ответственностью  
«НекстБио» – Генеральный  
директор Управляющей  
компании ООО «МБК»

Д.Л. Симачев

2014 г.



## ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов  
для экстракции ДНК из биологического материала

**«АмплиПрайм<sup>®</sup> ДНК-сорб-АМ»**

**АмплиПрайм<sup>®</sup>**



ООО «НекстБио»,  
Российская Федерация, 111394,  
город Москва, улица Полимерная, дом 8, стр. 2

IV

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                           |  |
|-----------------------------------------------------------|--|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....                                   |  |
| НАЗНАЧЕНИЕ .....                                          |  |
| ПРИНЦИП МЕТОДА .....                                      |  |
| ФОРМЫ ВЫПУСКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ .....                   |  |
| МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....                               |  |
| ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ .....             |  |
| СОСТАВ .....                                              |  |
| ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ .....              |  |
| СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ ..... |  |
| ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ .....             |  |
| СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ .....          |  |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

|                 |                                             |
|-----------------|---------------------------------------------|
| ВКО-FL          | – экзогенный внутренний контрольный образец |
| ВКО комплексный | – экзогенный внутренний контрольный образец |
| ДНК             | – дезоксирибонуклеиновая кислота            |
| ИППП            | – инфекции, передающиеся половым путем      |
| ОК              | – отрицательный контроль экстракции         |
| ОКО             | – отрицательный контрольный образец         |
| ПК              | – положительный контроль экстракции         |
| ПКО             | – положительный контрольный образец         |
| ПЦР             | – полимеразная цепная реакция               |

## НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» предназначен для экстракции ДНК из биологического материала (отделяемое слизистых оболочек влагалища, цервикального канала, уретры, ротоглотки, прямой кишки, конъюнктивы глаза, эрозивно-язвенных поражений кожи и слизистых оболочек; моча) для последующего (качественного или количественного) исследования на наличие ДНК возбудителей ИППП, других инфекций органов репродукции и инфекций мочевыводящих путей методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Кроме того, комплект реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» используется для экстракции ДНК из образцов смеси бактериальных культур, полученных путем посева биологического материала на жидкую или плотную питательную среду, для последующего исследования на наличие ДНК возбудителей гнойно-септических инфекций и генетических маркеров антибиотикорезистентности у этих возбудителей методом ПЦР.

Экстракция ДНК является преаналитической процедурой метода ПЦР в клинической лабораторной диагностике.

Объем исследуемого образца для экстракции: 100 мкл.

**ВНИМАНИЕ!** Информацию о порядке взятия, условиях транспортирования и хранения исследуемого материала, необходимости и порядке его подготовки к экстракции ДНК, а также информацию об интерферирующих веществах и ограничениях, связанных с пробой, смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

## ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследуемый образец<sup>1</sup> обрабатывается лизирующим раствором в присутствии

<sup>1</sup> Для некоторых видов биологического материала требуется помещение материала в транспортную среду и/или этап пробоподготовки, см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

частиц силики – сорбента. В результате происходит деструкция клеточных мембран, вирусных оболочек и других биополимерных комплексов и высвобождение ДНК. Растворенная ДНК в присутствии лизирующего раствора связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и его последующей отмывке. При добавлении буфера для элюции 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 1 форме комплектации:

**Форма 1** включает комплект реагентов «АмплиПрайм<sup>®</sup> ДНК-сорб-АМ» вариант 100С.

## МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических 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 реагенты, 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

отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.

- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты 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, автоматических дозаторов с фильтром<sup>2</sup>. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Комплект реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Комплект реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять комплект реагентов строго по назначению.
- К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинической диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасные возбудители паразитарных болезней»).
- Не использовать комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка, внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции.
- Не использовать комплект реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках, исключая контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

<sup>2</sup> Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники с фильтром.

- Листы безопасности реагентов (SDS – Safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.

## **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ**

1. Одноразовые полипропиленовые закручивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
2. Закручивающиеся крышки к пробиркам (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк.»), США, или аналогичные).
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 100, до 200 и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
6. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичный).
7. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия) или аналогичные).
8. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).

9. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SI BioSan, Латвия, или аналогичный).
10. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надсадочной жидкости (например, «ОМ-1» (ООО «Утес», Россия), и аналогичный).
11. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит Россия, или аналогичные).
12. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
13. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
14. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» вариант 100С – комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – включает:

| Реагент               | Описание                                    | Объем, мл | Количество |
|-----------------------|---------------------------------------------|-----------|------------|
| Лизирующий раствор    | Прозрачная бесцветная жидкость <sup>3</sup> | 30        | 1 флакон   |
| Отмывочный раствор    | Прозрачная бесцветная жидкость              | 100       | 1 флакон   |
| Сорбент универсальный | Суспензия белого цвета                      | 1,0       | 2 пробирки |
| Буфер для элюции В    | Прозрачная бесцветная жидкость              | 5,0       | 3 пробирки |
| ВКО-FL                | Прозрачная бесцветная жидкость              | 1,0       | 1 пробирка |
| ВКО комплексный       | Прозрачная бесцветная жидкость              | 1,0       | 1 пробирка |
| ОКО                   | Прозрачная бесцветная жидкость              | 1,2       | 2 пробирки |

Комплект реагентов вариант 100С рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Подготовка к проведению процедуры экстракции ДНК

1. Включить термостат и установить температуру 65 °С.
2. Прогреть **лизирующий раствор**, если он хранился при температуре от 2 до 8 °С, периодически перемешивая, при температуре 65 °С до полного раствора кристаллов.
3. Отобрать необходимое количество одноразовых полипропиленовых пробирок объемом 1,5 мл с завинчивающимися или плотно закрывающимися крышками (включая отрицательный и положительный контроли экстракции, если предусмотрены для проведения ПЦР-исследования). Промаркировать.
4. Подготовить и расставить в штативе пробирки с биологическими образцами. Осадить капли материала со стенок пробирки и внутренней части крышки в вихре, после чего аккуратно перемешать содержимое пробирки на вихре, избегая разбрызгивания и попадания материала на внутреннюю часть крышки.

Процедура экстракции ДНК

1. Внести в подготовленные одноразовые пробирки по **10 мкл ВКО комплексного** или **ВКО-FL** в зависимости от метода детекции продуктов ПЦР (см. инструкцию к набору реагентов для проведения амплификации). При использовании набора

реагентов с разными методами детекции допускается внесение в одну пробирку двух реагентов ВКО по 10 мкл каждого.

2. Ресуспендировать **сорбент универсальный**, интенсивно перемешивая на вортексе. Внести в каждую пробирку по **20 мкл** ресуспендированного **сорбент универсального**, после чего внести по **300 мкл лизирующего раствора**.

**ВНИМАНИЕ!** Если количество обрабатываемых биологических образцов составляет более 50 за рабочую смену, рекомендуется добавить весь объем сорбента и ВКО в флакон с лизирующим раствором (2 мл сорбента универсального и 1 мл ВКО на 30 мл лизирующего раствора). Полученную суспензию тщательно перемешать и внести по 330 мкл в подготовленные пробирки. Допускается хранение смеси не более 2 сут при комнатной температуре. Перед применением суспензию тщательно перемешать.

3. Внести в пробирки с ВКО, лизирующим раствором и сорбентом универсальным по **100 мкл исследуемых образцов**<sup>4, 5</sup>, используя для каждой пробы отдельный наконечник с фильтром.
4. В пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести **100 мкл ОКО**<sup>4</sup>, в пробирку положительного контроля (ПК) экстракции внести **90 мкл ОКО**<sup>4</sup> и **10 мкл ПКО**<sup>4</sup> (если он предусмотрен для проведения ПЦР-исследования)<sup>6</sup>.
5. Плотно закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе. Поместить пробирки в термостат с температурой **65 °С** на **5 мин**. Перемешать на вортексе и оставить штативе при комнатной температуре на **2 мин**.
6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **30 сек** при **7 тыс** (например, 10 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation).
7. Не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
8. Добавить в пробирки по **1 мл отмывочного раствора**, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента.
9. Повторить пп. 6-7.

<sup>3</sup> При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

<sup>4</sup> Допускается изменение объема исследуемых и контрольных образцов, см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

<sup>5</sup> Для образцов мочи необходимо произвести предобработку согласно методическим рекомендациям «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанным ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора.

10. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин** для подсушивания сорбента.
11. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В**. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин**. Допускается при необходимости увеличение объема элюции до **250 мкл**<sup>7</sup> (см. инструкцию к набору реагентов для проведения амплификации).
12. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс g** (например, 12 тыс об/мин для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation). Надосадочная жидкость содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °C в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °C в течение года. Для этого необходимо, не захватывая сорбент, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

---

<sup>6</sup> Результаты постановки контролей этапа экстракции используются при оценке достоверности результатов ПЦР-исследования биологических образцов. Анализ и оценка результатов для контролей проводится согласно инструкции к набору реагентов для проведения амплификации.

<sup>7</sup> Количество буфера для элюции, входящего в состав комплекта реагентов, рассчитано на проведение элюции в 150 мкл. В случае если для проведения амплификации требуется увеличение объема элюции до 250 мкл, дополнительное количество буфера для элюции входит в состав набора реагентов для проведения амплификации.

## **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 8 °С не более 7 сут. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут. При получении разуккомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения.

**Хранение.** Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 25 °С, кроме ВКО комплексного и ВКО-FL. ВКО комплексный и ВКО-FL хранить при температуре от 2 до 8 °С.

## **ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ**

Производитель гарантирует соответствие основных параметров и характеристик комплекта реагентов, требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество комплекта реагентов «АмплиПрайм® ДНК-сорб-АМ» направлять в адрес предприятия-производителя ООО «НекстБио» (111394 г. Москва, ул. Полимерная, 8 стр.2) в отдел по работе с рекламациями (тел. (495) 620-08-73, e-mail: [info@nextbio.ru](mailto:info@nextbio.ru)).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению комплекта реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации комплекта реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

|                                                                                     |                                  |                                                                                    |                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|    | Номер в каталоге                 |   | Максимальное число тестов                 |
|    | Код партии                       |   | Использовать до                           |
|    | Изделие для in vitro диагностики |   | Применять согласно прилагаемой инструкции |
|    | Дата изменения                   |   | Производитель                             |
|    | Ограничение температуры          |   | Дата изготовления                         |
|   | Хрупкое. Осторожно               |  | Верх                                      |
|  | Беречь от влаги                  |                                                                                    |                                           |

Руководитель Общества с ограниченной  
ответственностью «НекстБио» –  
Генеральный директор Управляющей  
компаний ООО «МБК»



Д.П. Симачева