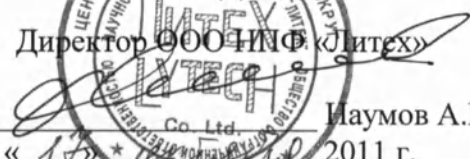


УТВЕРЖДАЮ
Директор ООО ЧИФ «Литех»

Наумов А.Ю.
« 17 » * 2011 г.


ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для
подготовки образцов биопроб
с целью последующего анализа методом масс-спектрометрии

(MALDI-TOF -ПРОБА)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Набор реагентов MALDI-TOF-ПРОБА предназначен для подготовки образцов микроорганизмов для анализа методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Набор реагентов MALDI-TOF - ПРОБА предназначен для применения только in vitro.

1.2. Набор реагентов рассчитан на подготовку к исследованию 1000 неизвестных образцов микроорганизмов.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Анализ микроорганизмов с помощью набора MALDI-TOF – ПРОБА основан на получении индивидуального белкового профиля микроорганизма с помощью MALDI (Матричная Лазерная Десорбция Ионизация) - TOF (Времяпролетная) масс-спектрометрии и последующем анализе масс-спектра.

Для рутинных задач клинической микробиологии (видовое типирование) используется метод прямого нанесения образца. В случае если необходимо провести более детальный анализ белкового профиля микроорганизма, используется процедура белковой экстракции.

2.2. Состав набора

В состав набора реагентов входят следующие компоненты (см. табл.1):

Таблица 1.

Компонент	Фасовка
Реагент 1 (Ацетонитрил)	600 мкл
Реагент 2 (Муравьиная кислота, 70 %)	600 мкл
Реагент 3 (Основной органический растворитель, OS)*	2 мл
Матрица порционная НССА**	4 пробирки (по 2,5 мг)
Бактериальный стандарт***	1 пробирка

* - OS представляет собой 2,5 % раствор трифторуксусной кислоты в 50% ацетонитриле

** - Матрица порционная НССА представляет собой кристаллы α -циано 4 гидроксикоричной кислоты

***- Бактериальный стандарт представляет собой смесь лиофилизированных белков E.coli DH5alpha с добавлением РНК-азы А (13 683 Da) и миоглобина (16 952 Da). Покрывает диапазон масс от 4 до 17 кДа. 1 пробирка бактериального стандарта рассчитана на 40 нанесений. 1 нанесения стандарта хватает на анализ 96 или 384 (в зависимости от конфигурации мишени) образцов.

Примечание. Для подготовка образцов необходимо использование следующих расходных материалов:

– петли одноразовые микробиологические на 1 мкл; 100- шт. (Greiner Bio-one; кат. номер 7311165);

– пробирки микроцентрифужные на 1,5 мл; 1000 шт. (Eppendorf; кат. номер 0030 125.150)

По желанию клиента набор может быть укомплектован указанными расходными материалами.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Правильно выполненная подготовка образцов с использованием данного набора позволяет получать масс-спектры основных белков микроорганизмов с характеристиками, не хуже:

- разрешение (ширина пиков на половине высоты): не менее 400;
- погрешность определения масс (для 5 наиболее интенсивных пиков рибосомальных белков E.coli DH5alpha): не более 300 ppm;
- чувствительность: отношение сигнал/шум для 5 наиболее интенсивных пиков рибосомальных белков E.coli DH5alpha (пробоподготовка не менее 10^8 клеток E.coli DH5alpha): не менее 15:1.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения – класс 1.

4.2. Реагенты, входящие в состав набора (ацетонитрил, муравьиная кислота, раствор трифторуксусной кислоты), являются токсическими веществами, при работе с которыми следует соблюдать строгие меры предосторожности: работать в халате и перчатках, при попадании реактива на кожу или слизистые тщательно промыть большим количеством мыла и воды, не вдыхать пары трифторуксусной кислоты.

4.3. Меры предосторожности - соблюдение "Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе

в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР" (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с анализируемым биоматериалом следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. биологический материал человека может являться источником инфекционных заболеваний.

5. ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И МАТЕРИАЛЫ

- 1) MALDI TOF масс-спектрометр в комплекте с мишенью для нанесения проб;
- 2) Микроцентрифуга, развивающая ускорение 12000 об/мин, для пробирок типа Эппендорф объемом 1,5 мл.
- 3) Микроцентрифуга типа «Вортекс».
- 4) Вакуумный насос с колбой-ловушкой.
- 5) Пипетки-дозаторы переменного объема: 0, 5-10 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл.
- 6) Наконечники для дозаторов одноразовые на объемы: 0, 5-10 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл.
- 7) Дистиллятор.
- 8) Спирт этиловый безводный или обезвоженный неденатурированный с концентрацией основного вещества $\geq 9,8\%$ (фирма SIGMA-Aldrich, Кат. № 24102).
- 9) Вода деионизованная, реактив для ВЭЖХ (фирма SIGMA-Aldrich, Кат. № 95304).
- 10) Перчатки одноразовые.
- 11) Пробирки микроцентрифужные на 1,5 мл
- 12) Петли микробиологические одноразовые на 1 мкл.

6. ПРОБОПОДГОТОВКА

6.1 Приготовление рабочего препарата бактериального стандарта.

6.1.1. Добавить 40 мкл реагента 3 в пробирку с бактериальным стандартом, тщательно перемешать пипетированием.

6.1.2. Полученный раствор разделить на несколько частей (аликвот) и заморозить. Избегать оттаивания и повторного замораживания полученных аликвот. Хранить при температуре -18°C и ниже.

6.2. Приготовление раствора матрицы

6.2.1. Добавить 250 мкл реагента 3 в пробирку с матрицей

6.2.2. Перемешивать на вортексе до полного растворения кристаллов матрицы

6.2.3. Хранить в темноте при комнатной температуре в течение недели.

6.3. Подготовка образцов для масс-спектрометрии (метод прямого нанесения)

6.3.1. Единичную (в случае использования материала первичного посева) колонию или несколько колоний (в случае работы с чистой культурой) свежей культуры с помощью одноразовой петли перенести на 1 ячейку мишени прибора и равномерно распределить по ячейке. Высушить при комнатной температуре в течение 1-2 мин.

6.3.2. После высыхания на образец наложить 1 мкл раствора матрицы. Высушить при комнатной температуре в течение 1-2 мин.

6.3.3. После высыхания матрицы проводить измерения на масс-спектрометре.

6.4. Белковая экстракция.

6.4.1. В 1,5 мл пробирку Eppendorf добавить 300 мкл деионизованной воды.

6.4.2. Одноразовой петлей на 1 мкл перенести колонию (в случае чистой культуры) или несколько колоний (в случае использования материала первичного посева) в пробирку.

- 6.4.3. Тщательно перемешать на вортексе.
- 6.4.4. Добавить 900 мкл этилового спирта.
- 6.4.5. Центрифугировать на 12 000 об/мин в течение 2 минут.
- 6.4.6. С помощью вакуумного насоса отобрать супернатант.
- 6.4.7. Осадить капли со стенок пробирок на вортексе и отобрать жидкость вакуумным насосом.
- 6.4.8. К осадку добавить 50 мкл реагента 2. Перемешать на вортексе.
- 6.4.9. Добавить 50 мкл реагента 1.
- 6.4.10. Центрифугировать на 12 000 об/мин в течение 2 минут.
- 6.4.11. 1 мкл супернатанта нанести на ячейку мишени. Высушить на воздухе в течение 1-2 минут.
- 6.4.12. После высыхания образца наслоить 1 мкл раствора матрицы. Высушить на воздухе в течение 1-2 минут.
- 6.4.13. После высыхания матрицы проводить измерения на масс-спектрометре.

6.5. Калибровка

- 6.5.1. Нанести 1 мкл раствора рабочего препарата бактериального стандарта на 1 ячейку мишени.
- 6.5.2. После высыхания на образец наслоить 1 мкл матрицы.
- 6.5.3. Провести калибровку масс в соответствии с инструкцией по эксплуатации масс-спектрометра.

Калибровку необходимо проводить перед каждым измерением.

Примечание: Нанесенный на мишень бактериальный стандарт предназначен для многократного использования. Повторное нанесение стандарта необходимо:

- После промывки мишени;
- В случае если на масс-спектре стандарта отсутствуют пики 16 952 Da (Миоглобин) и 13683 Da(РНК-аза А).

6.6. Обработка мишени для повторного использования

- 6.6.1. Хорошо промыть мишень под струей проточной воды.
- 6.6.2. Мягкой губкой (НЕ МЕТАЛЛИЧЕСКОЙ!!!) движениями вдоль мишени (НЕ ПОПЕРЕК!!!) смыть остатки аналита и матрицы. Сполоснуть мишень дистиллированной водой.
- 6.6.3. Промыть чип 70 % этанолом, ополоснуть дистиллированной водой.
- 6.6.4. Еще раз промыть мишень 70 % этанолом, смыть остатки спирта дистиллированной водой.
- 6.6.5. Ополоснуть мишень реагентом 1.
- 6.6.6. Положить мишень на салфетку в вытяжной шкаф, прикрыть крышкой или специальной безворсовой салфеткой, дать высохнуть.

Очень важно не нанести механических повреждений поверхности мишени и избежать загрязнения мишени пылевыми или инородными частицами (ворс от салфеток).

Примечание. Работать в перчатках, не выключать проточную воду на протяжении всей работы (работа с органическими растворителями) !!!

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1. Условия хранения

Набор реагентов должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при комнатной температуре в течение всего срока годности набора. Срок годности комплекта – 12 мес.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению.

По вопросам, касающимся качества набора MALDI-TOF-ПРОБА, следует обращаться в ООО НПФ «Литех» по адресу: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская д.1, стр.3, телефон/факс: (495)589-14-03, или (e.mail) info@lytech.ru

Исполнительный директор
ООО НПФ «Литех»



Байцур С.Г.

«СОГЛАСОВАНО»

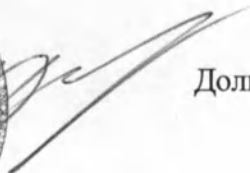
Зав. кафедрой

клинической лабораторной диагностики

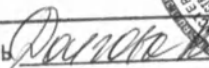
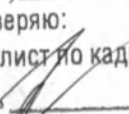
ГБОУ ДПО РМАПО

Минздравсоцразвития России

д.м.н., профессор

Долгов В.В.

Подпись	
удостоверяю:	
Специалист по кадрам РМАПО	
Подпись	
"	"
	20 ____ года