

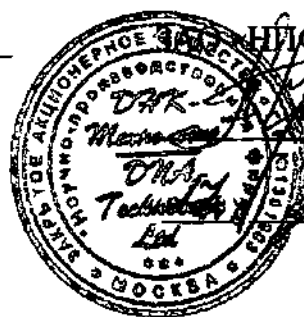
УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г № _____



НИИ «ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ



по применению комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот

ПРОБА-НК/ПРОБА-НК-ПЛЮС

КОПИЯ ВЕРНА

ГЕН. ДИРЕКТОР

НАЗНАЧЕНИЕ

ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.

1.1. Комплект реагентов предназначен для получения препарата ДНК/РНК из биологического материала (периферическая кровь, слюна, мокрота, молоко, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и др.) для последующего анализа методом обратной транскрипции (РНК) и/или полимеразной цепной реакции (ДНК).

1.2. Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.3 Комплект предназначен для применения in vitro.

1.4 Комплект рассчитан на выделение ДНК/РНК из 50 или 100 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 СОСТАВ КОМПЛЕКТА

Комплект имеет две формы комплектации:

КОМПЛЕКТАЦИЯ «ПРОБА-НК» (НА 50 И 100 ОБРАЗЦОВ)

Реактив	На 50 образцов	На 100 образцов
лизирующий раствор	15 мл 1 флакон	30 мл 1 флакон
реагент для преципитации	20 мл 1 флакон	40 мл 1 флакон
промывочный раствор №1	25 мл 1 флакон	50 мл 1 флакон
промывочный раствор №2	15 мл 1 флакон	30 мл 1 флакон
буфер для растворения,	по 1,25 мл 2 пробирки	по 1,25 мл 4 пробирки
отрицательный контрольный образец (К-),	1,5 мл 1 пробирка	по 1,5 мл 2 пробирки
внутренний контрольный образец (РНК-ВК),	500 мкл 1 пробирка	1,0 мл 1 пробирка
внутренний контрольный образец (ДНК-ВК),	500 мкл 1 пробирка	1,0 мл 1 пробирка

КОМПЛЕКТАЦИЯ «ПРОБА-НК-ПЛЮС» (НА 50 И 100 ОБРАЗЦОВ)

Реактив	На 50 образцов	На 100 образцов
лизирующий раствор	15 мл 1 флакон	30 мл 1 флакон
реагент для преципитации	20 мл 1 флакон	40 мл 1 флакон
промывочный раствор №1	25 мл 1 флакон	50 мл 1 флакон
промывочный раствор №2	15 мл 1 флакон	30 мл 1 флакон
буфер для растворения,	15 мл 1 флакон	30 мл 1 флакон
отрицательный контрольный образец (К-),	1,5 мл 1 пробирка	по 1,5 мл 2 пробирки

Примечание: При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65 °С.

2.2 Время проведения выделения - 1 ч.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

3.1. При работе с комплектом реагентов необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии,

противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

3.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

3.3. Работать с комплектом следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

3.4. При работе с комплектом следует использовать только новые наконечники и пробирки.

3.5. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

3.6. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

3.7. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

3.8. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

3.9. Поверхности рабочих столов, а также помещения, в которых проводится выделение НК, следует обязательно до и после проведения работ облучать бактерицидными лампами в течение 1 часа.

3.10. Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.2.731-99. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих средств, регламентированных санитарными правилами.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.1888-04.

При работе с комплектом реагентов «ПРОБА-НК» требуются следующие оборудование и материалы:

- термостат твердотельный на 65 °С;
- центрифуга настольная на 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объёмом 1 20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- перчатки одноразовые резиновые;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

При выделении НК из мокроты (способ 1):

- 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия;
- 1М раствор HCl;
- 5% раствор хлорамина;
- вода дистиллированная.

При выделении НК из мокроты (способ 2):

- муколизин.

При выделении НК из мочи, слюны, ликвора, синовиальной жидкости:

- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

5. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА К ВЫДЕЛЕНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

5.1. Образцы периферической крови

5.1.1 Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

5.1.2 Содержимое пробирки перемешивают переворачиванием 2-3 раза.

5.1.3 Центрифугировать пробирки при 3000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

5.1.4 Отобрать автоматической пипеткой верхнюю фракцию (плазма) и перенести в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости плазму допускается хранить при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев.

5.2. Мокрота

Способ 1.

5.2.1 Примерно 500 мкл биологического материала перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

5.2.2 К пробе мокроты добавить равный объем 10% трехзамещенного фосфорнокислого натрия $\times 12H_2O$, интенсивно встряхнуть.

5.2.3 Смесь инкубировать в течение 18-24 ч при температуре 37 °С, затем нейтрализовать 1М HCl до pH 6,8-7,4.

5.2.4 Центрифугировать в течение 20 мин при 1000 об/мин.

5.2.5 Надосадочную жидкость слить в 5% раствор хлорамина для обеззараживания.

5.2.6 Добавить к осадку 500 мкл дистиллированной воды, перемешать пипетированием и перенести в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

5.2.7 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

5.2.8 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок+жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения НК.

Способ 2.

5.2.9 В контейнер с образцом добавить муколизин в соотношении 5 : 1 (5 частей муколизина к 1 части мокроты), ориентируясь по градуировке контейнера. Закрутить крышку контейнера, встряхнуть содержимое и инкубировать 20-30

минут при комнатной температуре (18–25 °C), каждые 2-3 минуты встряхивая контейнер.

Полученный материал готов для выделения НК.

Обработанную мокроту допускается хранить в контейнере в течение суток при температуре от 2-8 °C или длительно при температуре не выше минус 16 °C (в случае необходимости повторного выделения РНК/ДНК).

5.3. Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки полости, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.)

5.3.1 Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки полости, из уретры, заднего свода влагалища, цервикального канала и др.) с помощью одноразовых стерильных зондов перенести в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или 500 мкл физиологического раствора), аккуратно перемешать.

5.3.2 Зонд извлечь, прижимая его к стенке пробирки и отжимая избыток жидкости. Пробирку плотно закрыть.

5.3.3 Пробирки, содержащие анализируемый материал, центрифугировать в течение 10 мин при 13000 об/мин.

5.3.4 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения НК.

Примечание: перед взятием соскоба из цервикального канала необходимо удалить слизь стерильным ватным тампоном.

5.4. Моча

5.4.1 Порцию утренней мочи (примерно 50 мл) следует собрать в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

- 5.4.2 Перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.
- 5.4.3 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.4.4 Наиболее полно удалить надосадочную жидкость.
- 5.4.5 Добавить к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.
- 5.4.6 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- 5.4.7 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения НК.

5.5. Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

- 5.5.1 Слюну, ликвор, синовиальную жидкость (примерно 500 мкл) перенести в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

- 5.5.2 Перенести 500 мкл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

- 5.5.3 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

- 5.5.4 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

- 5.5.5 Добавить к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

- 5.5.6 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.
- Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения НК.

5.6. Сперма, секрет предстательной железы

5.6.1 Перенести 20-30 мкл жидкого материала пипеткой в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл с консервантом (или 500 мкл стерильного физиологического раствора).

5.6.2 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин.

5.6.3 Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 100 мкл (осадок + жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения НК.

5.7. Молоко

5.7.1. Собрать материал в стерильную посуду и плотно закрыть крышкой.

5.7.2. Аккуратно переменить и перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

Полученный материал готов для выделения НК.

Срок сбора молока не более 24 часов. Хранение в течение всего срока сбора при температуре 2-8 °С.

5.8. Транспортировка и хранение исследуемого материала

Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования при 2-8 °С не более 24 часов.

ВНИМАНИЕ! Время от момента взятия периферической крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Допускается хранить полученный материал при температуре минус 20 °С в течение 3 месяцев.

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

6.1. Выделение РНК/ДНК из исследуемого материала

Примечание: В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, флакон прогреть при температуре 65 °С до полного растворения осадка.

6.1.1. Для исследования необходимо промаркировать необходимое количество чистых пластиковых пробирок объемом 1,5 мл с учетом пробирки для отрицательного контрольного образца («К »).

Примечание: Для образцов, прошедших предобработку с получением осадка и надосадочной жидкости (см. п.5: мокрота – способ 1, слюна, моча, ликвор, сперма, секрет предстательной железы), маркируются пробирки с подготовленным для исследования материалом в объеме 100 мкл.

6.1.2. Внести по 10 мкл внутреннего контрольного образца РНК-ВК или ДНК-ВК во все промаркированные пробирки (в случае, если предусмотрено использование ВК).

6.1.3. Добавить в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

6.1.4. В пробирки для исследуемых образцов добавить по 100 мкл исследуемого материала. За исключением образцов, прошедших предобработку с получением осадка (см. п. 5) и пробирки «К-». В пробирку, маркированную «К-», добавить 100 мкл отрицательного контрольного образца.

6.1.5. Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.

6.1.6. Термостатировать пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре (18-25 °С).

6.1.7. Добавить в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхнуть на вортексе в течение 3-5 с.

6.1.8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

6.1.9. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

6.1.10. Добавить к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

6.1.11. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

6.1.12. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

6.1.13. Добавить к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки.

6.1.14. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.

6.1.15. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

6.1.16. Открыть крышки пробирок и высушить осадок при температуре 65 °C в течение 5 мин.

6.1.17. При использовании комплекта «ПРОБА-НК»: Добавить к осадку 50 мкл буфера для растворения, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

7.3. При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе.

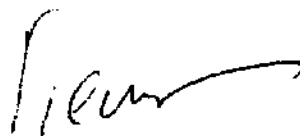
7.4. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.

По вопросам, касающимся качества комплекта ПРОБА-НК, следует обращаться по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д. 125ж, к.6, этаж 11,

телефон/факс (495) 980-45-55

Ведущий научный сотрудник
ЗАО «НПФ ДНК-Технология»,
кандидат биологических наук

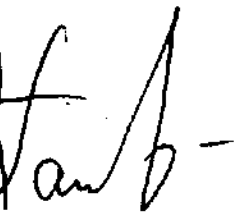


Т.В.Петрова

«17» ~~декабря~~ 2009 г

«СОГЛАСОВАНО»

Директор ФГБУ «Институт иммунологии» ФМБА России,
академик РАН и РАМН, профессор



/Р.М.Хаитов/

«17» марта 2010 г.

При использовании комплекта «ПРОБА-НК-ПЛЮС»: Добавить к осадку 200 мкл буфера для растворения, встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 с.

6.1.18 Прогреть пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

Примечание: При работе с наборами ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП и ВИЧ-ГЕН рекомендуется растворять осадок в 16,5 мкл буфера для растворения, так как увеличение объема буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.

6.1.18. Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Препарат НК готов для постановки реакции обратной транскрипции (РНК) или проведению ПЦР (ДНК).

Примечание: Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

Препарат ДНК можно хранить при температуре минус 20 °С не более 1 месяца или при температуре минус 70 °С не более 1 года.

7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТА

7.1. Срок годности комплекта – 6 мес.

7.2. Комплект реагентов следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности комплекта.