

УТВЕРЖДЕНА

УТВЕРЖДАЮ

Приказом Росздравнадзора

Генеральный директор

от _____ 200__ г. № _____

ЗАО «НПО ДНК-Технология»

Д.Ю.Трофимов

«29» июля 2009 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для выделения ДНК
(ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА)

Комплектация «ПРОБА-ГС», «ПРОБА-ГС-ПЛЮС»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

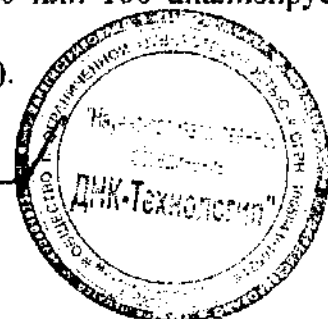
1.1 Комплект реагентов предназначен для получения препарата ДНК из биологического материала (слюна, моча, сперма, секрет предстательной железы, ликвор, соскобы эпителиальных клеток с задней стенки глотки, из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища и др.) для последующего анализа методом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

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

1.3 Комплект предназначен для применения *in vitro*.

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

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕН. ДИРЕКТОР
ДМИТРОВСКИЙ В.Ю.



2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего раствора. Метод удобен, технологичен и пригоден для подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важно тщательное соблюдение инструкции по применению. Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

2.2 СОСТАВ КОМПЛЕКТА

Комплект имеет две формы комплектации:

	ПРОБА-ГС		ПРОБА-ГС-ПЛЮС
	100 образцов	50 образцов	100 образцов
лизирующий раствор	1 флакон (15 мл)	1 флакон (7,5 мл)	1 флакон (15 мл)
сорбент	2 пробирки (по 1,0 мл)	1 пробирка (1,0 мл)	2 пробирки (по 1,0 мл)
промывочный	1 флакон	1 флакон	1 флакон

раствор №1	(20 мл)	(10 мл)	(20 мл)
промывочный раствор №2	1 флакон (20 мл)	1 флакон (10 мл)	1 флакон (20 мл)
промывочный раствор №3	1 флакон (20 мл)	1 флакон (10 мл)	1 флакон (20 мл)
элюирующий раствор	1 флакон (10 мл).	1 флакон (5 мл).	1 флакон (20 мл).

2.3 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-ГС»/«ПРОБА-ГС-ПЛЮС» требуются следующие оборудование и материалы:

- термостат твердотельный на 50 °С;
- центрифуга настольная на 13000 об/мин;
- микроцентрифуга/вортекс;

- холодильник бытовой с морозильной камерой;
- пробирки пластиковые объемом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой "RNAase-free, DNAase-free" объемом 1 20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- перчатки одноразовые резиновые;

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

5.1.1 Соскобы эпителиальных клеток (с задней стенки глотки, 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.

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

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

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

Полученный материал готов для выделения ДНК.

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

5.2. Моча

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

5.2.2 Перенести 1,0 мл материала в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл.

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

5.2.4 Наиболее полно удалить надосадочную жидкость.

5.2.5 Добавить к осадку 1,0 мл физиологического раствора стерильного.

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

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

Полученный материал готов для выделения ДНК.

5.3. Слюна, ликвор, синовиальная жидкость

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

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

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

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

5.3.5 Добавить к осадку 500 мкл физиологического раствора стерильного.

5.3.6 Центрифугировать пробирку при 13000 об/мин в течение 10 мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

Полученный материал готов для выделения ДНК.

5.4 Сперма, секрет предстательной железы

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

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

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

Полученный материал готов для выделения ДНК.

5.5 Транспортировка и хранение исследуемого материала

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

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

6. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

6.1 Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внести 50 мкл физиологического раствора стерильного.

6.2 В отдельной пластиковой пробирке смешать $150 \times (N+1)$ мкл лизирующего раствора и $20 \times (N+1)$ предварительно ресуспендированного сорбента, где $N+1$ – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

6.3 Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

6.4 Термостатировать пробирки при температуре 50 °С в течение 20 мин.

6.5 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.6 Удалить надосадочную жидкость.

6.7 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

6.8 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.9 Удалить надосадочную жидкость.

6.10 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

6.11 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

6.12 Удалить надосадочную жидкость.

6.13 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

6.14 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

6.15 Удалить надосадочную жидкость.

6.16 Открыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течении 5 мин.

6.17 При использовании комплекта «ПРОБА-ГС»: Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

При использовании комплекта «ПРОБА-ГС-ПЛЮС»: Добавить к осадку 200 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

6.18 Термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течение 5 мин.

6.19 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить п.6.18 - 6.19.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.6.19) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев.

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.

7.3 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте;

7.3 При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1.

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

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

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

телефон/факс (495) 980-45-55

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот

ПРОБА-ГС

Комплектация «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА»

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Комплект реагентов предназначен для получения препарата ДНК из цельной периферической крови для последующего проведения генетических исследований выделенной ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

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

1.3 Комплект предназначен для применения *in vitro*.

1.4 Комплект рассчитан на выделение ДНК из 48 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Метод основан на использовании для лизиса клеток сильного хаотропного агента - гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она легко снимается с помощью элюирующего раствора. Метод удобен, технологичен и пригоден для

подготовки образца к амплификации. Однако возможны потери ДНК вследствие необратимой сорбции на носителе, а также в процессе многочисленных отмывок. Особенно большое значение это имеет при работе с небольшими количествами ДНК в образце. Кроме того, даже следовые количества GuSCN могут ингибировать ПЦР. Поэтому при использовании этого метода очень важно тщательное соблюдение инструкции по применению. Следует отметить, что из-за большого количества стадий добавления и удаления растворов при работе с образцом требуется аккуратность, т.к. возможна перекрестная контаминация между пробами образующейся аэрозолью ДНК.

2.2 СОСТАВ КОМПЛЕКТА (на 48 образцов):

- лизирующий раствор - 1 флакон (7,2 мл);
- сорбент - 1 пробирка (960 мкл);
- промывочный раствор №1 - 1 флакон (19,2 мл);
- промывочный раствор №2 - 1 флакон (9,6 мл);
- промывочный раствор №3 - 1 флакон (9,6 мл);
- элюирующий раствор - 1 флакон (14,4 мл).

2.3 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-ГС-ГЕНЕТИКА» требуются следующие оборудование и материалы:

- термостат твердотельный на 50 °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" объемом 1 20 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- перчатки одноразовые резиновые;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

5. ВЗЯТИЕ И ПОДГОТОВКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Образцы цельной периферической крови

Взятие периферической крови проводится в пластиковые пробирки объемом 2,5 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2-3 раза после взятия материала.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Допускается хранение образцов при температуре 2-8 °С не более 24 ч.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Примечание: в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

6.1 Промаркировать необходимое количество пробирок пластиковых объемом 1,5 мл в соответствии с количеством анализируемых образцов.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объемом 1,5 мл внести 500 мкл стерильного физиологического раствора.

6.2 В отдельной пластиковой пробирке смешать 150х(N+1) мкл лизирующего раствора и 20х(N+1) предварительно ресуспендированного сорбента,

где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

6.3 Внести по 170 мкл полученной смеси в промаркированные пробирки.

6.4 Добавить 100 мкл периферической крови, перемешанной переворачиванием пробирки, в соответствующую пробирку с лизирующим раствором и сорбентом. Закрыть крышки пробирок. Встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

6.5 Термостатировать пробирки при температуре 50 °С в течение 10 мин.

6.5 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.7 Удалить надосадочную жидкость.

6.8 Добавить к осадку 400 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

6.9 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.10 Удалить надосадочную жидкость.

6.11 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

6.12 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °С).

6.13 Удалить надосадочную жидкость.

6.14 Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

6.15 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре (18-25 °C).

6.16 Удалить надосадочную жидкость.

6.17 Открыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течение 5 мин.

6.18 Добавить к осадку 300 мкл элюирующего раствора, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3-5 с.

6.19 Термостатировать пробирки при температуре 50 °C в течение 5 мин.

6.20 Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин при комнатной температуре.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в реакционную смесь для ПЦР-амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °C. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить п.6.19 - 6.20.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.6.20) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °C в течение 6 месяцев.

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.

7.3 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в темном месте;

7.4 При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем растворе и в промывочном растворе №1.

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

По вопросам, касающимся качества комплекта ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, 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

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «Институт иммунологии» ФМБА

России, академик РАН и РАМН, профессор



/Р.М.Хаитов/

«17» марта 2010 г.

Е.В.Гончарова

«19» декабря 2009 г.