

## ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения РНК и постановки обратной транскрипции («РНК-экстракт»)

### 1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Полное название набора: «Набор реагентов для выделения РНК и постановки обратной транскрипции».

1.2. Краткое название набора: «РНК-экстракт».

1.3. Область применения – клиническая лабораторная диагностика, генетика.

1.4. Набор предназначен только для применения *in vitro*.

1.5. Набор реагентов РНК-экстракт предназначен для выделения тотальной РНК из образцов различных тканей человека и постановки неспецифической обратной транскрипции с целью получения комплементарной ДНК (кДНК), которую в дальнейшем можно использовать для анализа экспрессии необходимых генов с помощью ПЦР.

### 2. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

2.1. Набор реагентов РНК-экстракт предназначен для использования лабораторными специалистами с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшими подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности и получившим дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики.

### 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗДЕЛИЯ

#### 3.1. Состав набора.

В состав набора РНК-экстракт входит 13 емкостей различного объема:

Таблица 1. Реактивы для выделения РНК

Компонент	Описание	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мл
Раствор для гемолиза эритроцитов 30х	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 250 мл	1	165
Раствор для промывки ядерных клеток	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 125 мл	1	120
Раствор для лизиса клеток	Полупрозрачная светло-желтая или розовая жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 125 мл	2	65
Раствор для разделения фаз	Прозрачная бесцветная жидкость	Стеклянные флаконы вместимостью 100 мл	1	30
Раствор для осаждения РНК	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 125 мл	1	55
Раствор для промывки РНК	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 125 мл	1	100

Таблица 2. Реактивы для проведения реакции обратной транскрипции

Компонент	Описание	Тип фасовки	Кол-во, шт.	Объем компонента, мкл
Раствор для отжига	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с красной завинчивающейся крышкой	1	250
Буфер для обратной транскрипции	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с синей завинчивающейся крышкой	1	2000
Ингибитор РНКаз	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с желтой завинчивающейся крышкой	1	60
Ревертаза	Прозрачная бесцветная вязкая жидкость	Пластиковые пробирки вместимостью 0,5 мл с зеленой завинчивающейся крышкой	1	60
Вода деионизованная с добавлением 0,1% диэтилпиракарбоната (ДЭПК)	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	2	2000

Пробирки с компонентами набора для проведения реакции обратной транскрипции установлены в пластиковый или картонный штатив, штатив помещен в картонную коробку. Коробка с пробирками, флаконы и инструкция по применению помещены в герметично закрывающийся прозрачный пакет из полипропилена.

3.2. Данный набор рассчитан на выделение РНК и получение кДНК из 100 анализируемых образцов.

### 3.3. Принцип метода

Набор рассчитан на выделение тотальной РНК из периферической крови (в объеме не менее 5 мл), костного мозга (в объеме не менее 2 мл) или образцов ткани с линейными размерами от 0,2 до 2 мм. Принцип работы набора реагентов основан на нескольких последовательных стадиях. Сначала проводят обработку образца раствором для гемолиза эритроцитов (лизует эритроциты) и раствором для промывки (отмывает ядерные клетки от остатков разрушенных эритроцитов и иного дебриса). Затем с помощью гуанидин тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции РНК образца отделяется от ДНК и белков. Потом РНК осаждают из раствора и промывают. В дальнейшем проводится реакция обратной транскрипции, в которой с помощью фермента обратной транскриптазы (ревертазы) РНК транскрибируется в комплементарную ей цепь ДНК.

Набор реагентов обеспечивает высокую чистоту выделенной РНК:  $A_{260/280}=1,8-2,0$ . Полученная кДНК может служить материалом для проведения ПЦР.

## 4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1. Потенциальный риск применения набора РНК-экстракт - класс 2а.

4.2. Реагент «Раствор для лизиса клеток» содержит фенол и гуанидин-изотиоцианат, реагент «Раствор для разделения фаз» содержит хлороформ – токсичные и раздражающие вещества, не допускается попадание этих реагентов на кожу или слизистые оболочки, а также вдыхание их паров. Работу с данными растворами следует проводить в халате и одноразовых медицинских перчатках, с использованием вытяжного шкафа. При попадании на кожу рук или слизистые оболочки обработать место слабым раствором соды и промыть большим количеством проточной воды не менее 15 минут. При необходимости обратиться за медицинской помощью.

4.3. Остальные компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. При работе с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905 и общие требования безопасности к наборам реагентов для *in vitro* диагностики в соответствии с ГОСТ ISO 14971.

4.5. Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала, с соблюдением санитарно-эпидемических 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 с набором следует соблюдать требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

4.6. Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». При разливе реагентов, содержащих фенол, гуанидин-изотиоцианат или хлороформ, а также при утилизации остатков, смешать утилизируемую жидкость в соотношении не менее чем 1:1 с раствором слабой щелочи (0,1М гидроксид натрия/калия (NaOH/KOH) или раствором пищевой соды NaHCO<sub>3</sub>), нейтрализовать не менее 10 минут. Проветрить помещение не менее 3 часов.

4.7. Работу с набором реагентов и анализируемыми клиническими образцами следует проводить в халатах и одноразовых медицинских перчатках без талька.

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

4.9. Утилизировать неиспользованные реактивы необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4.10. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда и др., а также рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.11. Поверхности рабочих столов и боксы следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение одного часа.

4.12. Все работы должны выполняться только с использованием одноразовых наконечников с фильтром для полуавтоматических пипеток. Пробирки и наконечники должны быть свободны от нуклеаз (маркировка «DNAase/RNAase free»). Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.13. Лабораторная посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.14. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

4.15. Не использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида компонентов, указанному в паспорте к набору реагентов;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности набора.

## 5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РАБОТЫ С НАБОРОМ:

- вытяжной шкаф;
- термостат твердотельный на 95°C;
- центрифуга настольная с охлаждением, на 5000 об/мин для пробирок вместимостью 50 мл;
- центрифуга настольная с охлаждением, на 16000 об/мин для пробирок вместимостью 1,5 мл;
- насос с колбой–ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- микроцентрифуга/вортекс
- спектрофотометр;
- пробирки пластиковые вместимостью 50 мл с завинчивающейся крышкой (типа Фалькон);
- пробирки пластиковые вместимостью 1,5 мл (типа Эппендорф);
- пробирки пластиковые вместимостью 0,5 мл (типа Эппендорф);
- стеклянная колба с крышкой объемом не менее 0,5 л;
- стерильные одноразовые шприцы объемом на 2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: 0,5-10 мкл, 5-50 мкл и 20-200 мкл, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования (погрешность не более 3%);
- штативы для пробирок 1,5 мл;
- штативы для пробирок 0,5 мл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 1-10 мкл; 1-100 мкл; 1-200 мкл;
- холодильник фармацевтический типа Sanyo MPR-414F или бытовой с морозильной камерой, температура морозильной камеры не выше -18°C;
- перчатки медицинские без талька;
- контейнер с дезинфицирующим раствором;
- вода дистиллированная.

## 6. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ

### 6.1. Взятие и подготовка клинического материала

Периферическая кровь, костный мозг или образцы других тканей человека помещаются в пробирку, содержащую 1/5 часть от объема крови или костного мозга 6% раствора динатриевой соли этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) или 2% раствора цитрата натрия. Кровь и консервант перемешивают, переворачивая закрытую пробирку несколько раз. Транспортировать и хранить образцы биологического материала до начала исследования допускается при температуре 2–8°C не более 24 часов.

Внимание! Пробирки с консервантом не входят в состав набора! Для забора крови можно использовать стандартные вакутейнеры с ЭДТА (сиреневая крышка) или любые другие пробирки с добавленными в них указанными консервантами. При подготовке образцов нельзя использовать пробирки с гепарином!

### 6.2. Получение ядерных клеток из образцов тканей человека

6.2.1. Промаркировать по одной пластиковой пробирке объемом 50 мл для каждого образца, и по две пластиковые пробирки объемом 1,5 мл для каждого образца.

6.2.2. Извлечь набор из холодильника, достать флакон «Раствор для гемолиза эритроцитов 30х». Раствор из флакона развести в стеклянной колбе дистиллированной водой в 30 раз (1 часть раствора + 29 частей воды). Разведенный раствор может храниться при комнатной температуре в течение 1 недели.

6.2.3. Кровь, костный мозг или образец ткани человека вместе с консервантом перелить в пробирки объемом 50 мл и добавить 45 мл разведенного раствора для гемолиза эритроцитов. Перемешать, переворачивая закрытую пробирку несколько раз.

6.2.4. Инкубировать пробирку в холодильнике при 4°C 20-30 мин.

6.2.5. Центрифугировать пробирку при 1500 об/мин 20 мин при температуре 4°C.

6.2.6. Супернатант осторожно слить или удалить при помощи насоса, оставив на дне пробирки осадок белых клеток.

6.2.7. Если осадок имеет красноватый оттенок, т.е. содержит много нелизированных эритроцитов, нужно, добавив 1 мл раствора для гемолиза эритроцитов, повторить процедуру лизиса.

6.2.8. Ресуспендировать осадок клеток в 1 мл «Раствора для промывки ядерных клеток» и перенести в 1,5 мл пробирку.

6.2.9. Центрифугировать пробирку при 2000 об/мин 5 мин при температуре 4<sup>0</sup>С.

6.2.10. Супернатант слить или удалить при помощи насоса.

### 6.3. Выделение РНК из полученного осадка ядерных клеток

6.3.1. Извлечь набор из холодильника, достать флакон «Раствор для лизиса клеток».

6.3.2. К осадку ядерных клеток добавить 1200 мкл раствора для лизиса клеток.

6.3.3. Лизат клеток рекомендуется несколько раз пропустить через тонкую иглу небольшого (до 2 мл) стерильного одноразового шприца. При этом в результате фрагментации геномной ДНК вязкость лизата клеток должна значительно уменьшиться, и раствор станет более текучим, что позволит в дальнейшем получить РНК лучшего качества. При невозможности использовать шприц, можно ресуспендировать осадок пипетированием.

6.3.4. Лизированные образцы могут храниться при минус 20<sup>0</sup>С в течение 1 месяца.

6.3.5. Добавить в каждую пробирку 250 мкл «Раствора для разделения фаз».

6.3.6. Интенсивно встряхнуть пробирку на вортексе до получения однородного раствора молочно-белого цвета.

6.3.7. Инкубировать пробирку 10 минут при комнатной температуре.

6.3.8. Центрифугировать пробирку в течение 10 мин при 12000 об/мин при температуре 4<sup>0</sup>С.

6.3.9. Аккуратно перенести 500 мкл верхней водной фазы, содержащей РНК, в чистую 1,5 мл пробирку.

6.3.10. Добавить в каждую пробирку 500 мкл «Раствора для осаждения РНК», перемешать.

6.3.11. Инкубировать пробирки при минус 20<sup>0</sup>С не менее 3 ч или при минус 70<sup>0</sup>С не менее 1 часа (образцы можно оставить в морозильнике на ночь). На этой стадии образцы могут храниться при температуре минус 20<sup>0</sup>С в течение 1 месяца, при минус 70<sup>0</sup>С в течение 1 года.

6.3.12. Разморозить пробирки, перемешать.

6.3.13. Центрифугировать пробирки в течение 15 мин при 12000 об/мин.

6.3.14. Осторожно, чтобы не потерять осадок РНК, удалить супернатант.

6.3.15. К осадку РНК добавить 200 мкл «Раствора для промывки РНК».

6.3.16. Встряхнуть на вортексе, промывая осадок.

6.3.17. Центрифугировать пробирки в течение 5 мин при 12000 об/мин.

6.3.18. Супернатант аккуратно отобрать.

6.3.19. Повторить промывку (пп. 6.3.15-6.3.18).

6.3.20. Осадок РНК подсушить от остатков жидкости в термостате в течение 5-7 минут при 55<sup>0</sup>С в пробирках с открытой крышкой.

6.3.21. Сухой осадок РНК используют для синтеза кДНК.

### 6.4. Определение концентрации РНК

6.4.1. Растворить сухой осадок РНК в 24 мкл деионизованной воды с добавлением 0,1% диэтилпиракарбоната (ДЭПК). Раствор РНК можно хранить при минус 70<sup>0</sup>С в течение 1 года.

6.4.2. В реакции используется 1 мкг РНК каждого образца. Для получения раствора РНК с подходящей концентрацией проводится измерение концентрации РНК на спектрофотометре.

6.4.3. Для этого требуется подготовить пробирки на 0,5 мл по числу образцов.

6.4.4. В каждую пробирку добавить 246 мкл деионизованной или дистиллированной воды и 4 мкл раствора РНК, перемешать.

6.4.5. В кювету спектрофотометра внести получившийся раствор и измерить его при длине волны 260 нм и при длине волны 280 нм.

6.4.6.  $A_{260/280}$  РНК должно укладываться в пределы 1,8-2,0. Если  $A_{260/280}$  выходит за указанные пределы, качество РНК признается ненадлежащим, и требуется переабор клинического материала.

6.4.7. Значение  $A$  при длине волны 260 нм используется в расчетах. Если  $A_{260}$  меньше 0,5, то концентрация РНК в растворе меньше необходимой. В этом случае для получения 1 мкг РНК в реакции следует добавить  $0,4/A_{260}$  мкл исходного раствора РНК.

6.4.8. Если  $A_{260}$  больше 0,5, то концентрация РНК в растворе больше необходимой. В этом случае для получения 1 мкг РНК в реакции следует добавить  $(A_{260} * 25 - 10)$  мкл деионизованной воды (ДЭПК) к исходному раствору РНК, а в реакции использовать 2 мкл получившегося раствора.

## 6.5. Проведение реакции обратной транскрипции

6.5.1. Реакция обратной транскрипции проводится в объеме 20,5 мкл.

6.5.2. Подготовить пробирки на 0,5 мл по числу образцов, плюс 1 пробирка для отрицательного контроля.

6.5.3. В каждую пробирку внести 2 мкл раствора для отжига и такой объем раствора РНК, в котором содержится 1 мкг РНК.

6.5.4. Общий объем раствора для отжига и раствора РНК должен составить 6 мкл. При необходимости нужно довести объем до 6 мкл добавлением деионизованной воды (ДЭПК).

6.5.5. В пробирку отрицательного контроля вносится 4 мкл деионизованной воды (ДЭПК).

6.5.6. Поместить пробирки в амплификатор и инкубировать в течение 30 сек при 94°C. Можно инкубировать при 70°C в течение 3 мин в амплификаторе или в термостате.

6.5.7. Добавить в каждую пробирку 13 мкл буфера для обратной транскрипции, 0,5 мкл ингибитора РНКаз и 1 мкл ревертазы.

6.5.8. Поместить пробирки в амплификатор и инкубировать по следующей программе: 25°C - 10 мин, 60°C - 1 час, 70°C - 10 мин.

6.5.9. Добавить в каждую пробирку 30 мкл деионизованной воды (ДЭПК), перемешать.

6.5.10. Пробирки с кДНК можно хранить при минус 20°C в течение 1 месяца, при минус 70°C в течение 1 года.

## 7. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1. Транспортирование набора следует производить всеми видами крытого транспорта при температуре 2-8°C.

7.2. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных ТУ.

7.3. Срок годности набора - 12 месяцев со дня приемки набора отделом контроля качества предприятия-изготовителя. Срок годности указан на маркировке реактивов и набора.

7.4. Реактивы для выделения РНК должны храниться в холодильнике при температуре 2-8°C, реактивы для проведения реакции обратной транскрипции должны храниться в морозильнике при температуре минус 20°C в течение всего срока эксплуатации.

7.5. Все реактивы перед использованием необходимо тщательно перемешать.

7.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

## 8. БЕЗОПАСНАЯ УТИЛИЗАЦИЯ

8.1. Удалять неиспользованные, просроченные или отработанные реактивы из набора необходимо в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

По вопросам качества набора «РНК-экстракт» следует обращаться в ООО «ГеноТехнология» по адресу: 117485, Москва, ул. Профсоюзная, д. 104, тел. (499)530-01-95, (499)530-02-58, e-mail: info@genetechnology.ru, www.genetechnology.ru.