

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения ДНК («ДНК-экстракт»)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Полное название набора: «Набор реагентов для выделения ДНК».
- 1.2. Краткое название набора: «ДНК-экстракт».
- 1.3. Область применения – клиническая лабораторная диагностика, генетика.
- 1.4. Набор предназначен только для применения *in vitro*.
- 1.5. Набор реагентов ДНК-экстракт предназначен для выделения тотальной ДНК из образцов различных тканей человека, которую в дальнейшем можно использовать для анализа необходимых генов с помощью ПЦР.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

- 2.1. Набор реагентов ДНК-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 ДНК-экстракт входит 7 емкостей различного объема:

Таблица 1. Реактивы для выделения ДНК

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 мл
Раствор для промывки ядерных клеток	Прозрачная бесцветная жидкость	Пластиковые флаконы вместимостью 125 мл	1	120 мл
Раствор для экстракции ДНК	Полупрозрачная жидкость с осадком	Пластиковые пробирки вместимостью 2 мл с прозрачной крышкой	5	2 мл

Пробирки с компонентами набора установлены в 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. Набор рассчитан на выделение ДНК из 100 образцов различных тканей человека.

3.3. Принцип метода

Набор рассчитан на выделение тотальной ДНК 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 основан на последовательной обработке образца раствором для гемолиза эритроцитов (лизует эритроциты), раствором для промывки (отмывает ядерные клетки от остатков разрушенных эритроцитов и иного дебриса) и раствором для экстракции ДНК (очищает лизат клеток, после центрифугирования оставляя в надосадочном растворе выделенную ДНК).

Набор реагентов обеспечивает высокую чистоту выделенной ДНК: $A_{260/280}=1,6-2,0$. Экстрагированная ДНК может служить материалом для проведения ПЦР.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

4.2. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.3. 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.

4.4. 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».

4.5. 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».

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

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

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

4.9. 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.

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

4.11. 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.

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

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

4.14. 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:

- термостат твердотельный на 95°C;
- центрифуга настольная на 5000 об/мин для пробирок вместимостью 50 мл;
- центрифуга настольная на 16000 об/мин для пробирок вместимостью 1,5 мл;
- насос с колбой–ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- микроцентрифуга/вортекс;
- пробирки пластиковые вместимостью 50 мл с завинчивающейся крышкой (типа Фалькон);
- пробирки пластиковые вместимостью 1,5 мл (типа Эппендорф);
- стеклянная колба с крышкой объемом не менее 0,5 л;
- 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;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой “RNAase-free, DNAase-free” объемом 0,5-10 мкл; 5-50 мкл; 20-200 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 белый осадок 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°C.
- 6.2.10. Супернатант слить или удалить при помощи насоса.

6.3. Выделение ДНК из полученного осадка ядерных клеток.

- 6.3.1. Извлечь набор из холодильника, достать пробирку «Раствор для экстракции ДНК». Разморозить содержимое пробирки и встряхнуть на вортексе до образования однородной суспензии.
- 6.3.2. К осадку ядерных клеток добавить 100 мкл раствора для экстракции ДНК.
- 6.3.3. Интенсивно встряхнуть образец на вортексе в течение 20 сек.
- 6.3.4. Поместить образец в твердотельный термостат при температуре 95°C и инкубировать в течение 20 мин.
- 6.3.5. Еще раз интенсивно встряхнуть пробирку на вортексе в течение 20 сек.
- 6.3.6. Центрифугировать пробирку в течение 10 мин при 13-16000 об/мин.
- 6.3.7. Надосадочную жидкость, которая содержит экстрагированную ДНК, перенести в чистую пробирку. Полученный образец готов к использованию для проведения ПЦР. Экстракты ДНК можно хранить в морозильной камере холодильника при температуре минус 20°C не более 1 месяца или при температуре минус 70°C не более 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. Набор реактивов должен храниться в холодильнике при температуре 2-8°C, пробирки с «Раствором для экстракции ДНК» 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. Упаковка набора и неиспользованные компоненты набора относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами. Отработанные компоненты набора относятся к отходам класса Б. 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 «ДНК-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.