



БИО
СРЕДА

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов
для выделения ДНК и РНК**

УНИВЕРСАЛЬНЫЙ



ООО «Биологическая среда»,
Российская Федерация, 127015,
город Москва, улица Большая Новодмитровская д. 23, стр. 3

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПОРЯДОК ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	4
ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	4
ОГРАНИЧЕНИЯ	4
ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ	4
СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ	4
СТАБИЛЬНОСТЬ	4
ФОРМАТ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТА	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПЕРСОНАЛА	6
УТИЛИЗАЦИЯ	6
МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ	6
СОСТАВ	7
ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК И РНК	8
- подготовка к проведению процедуры	8
- протокол выделения из сухих образцов	8
- протокол выделения из жидких образцов	9
СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ	10
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	11
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ	11

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	рибонуклеиновая кислота
ПКО	положительный контрольный образец
ПЦР	полимеразная цепная реакция
НК	нуклеиновая кислота
УТК	универсальная транспортная карта
мл	миллилитр
СП	санитарные правила
МУ	методические указания

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов «Универсальный» – медицинское изделие предназначено для выделения ДНК и РНК из биологических материалов (крови, сыворотки, плазмы, суспензий органов, культур клеток, мазков, соскобов, мочи и др.) для последующего (качественного и количественного) исследования на наличие ДНК и РНК методом полимеразной цепной реакции. Выделение ДНК является преаналитической процедурой метода ПЦР в клинической лабораторной диагностике.

Информацию о порядке взятия, условиях транспортирования и хранении исследуемого материала, необходимости и порядке его подготовки к выделению ДНК, а также информацию об ограничениях, связанных с пробой, смотрите в инструкции к используемому набору для проведения амплификации.

Набор реагентов применяется только для профессионального использования.

ПОРЯДОК ВЗЯТИЯ МАТЕРИАЛА.

Порядок взятия материала см. инструкции к наборам по амплификации.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследуемый биологический материал связывается с лизирующим буфером, в результате чего происходит деструкция клеточных мембран и вирусных оболочек, разрушение липидного слоя, в результате чего освобождается НК. НК связывается с осадителем, в присутствии спиртов и центробежной силы концентрируется, осаждается на дне пробирки. При проведении отмывки осадка НК освобождается от продуктов распада клеточных элементов, белков, полисахаридов и компонентов лизис-буфера, после центрифугирования НК свободная от белков и ингибиторов реакции ПЦР остается в виде осадка на дне пробирки. Готовый продукт НК растворяется в элюирующем буфере и используется в ПЦР и обратной транскрипции.

ОЖИДАЕМЫЙ РЕЗУЛЬТАТ

Время, затраченное на анализ 10 проб, составляет 30 мин, 100 проб – 50 мин.
В процессе выделения выходит высокоочищенный продукт НК не менее 5мкг.

ОГРАНИЧЕНИЯ

В работе не могут использоваться сильно гемолизованные образцы. Противопоказания – не имеются (не выявлены).

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Коэффициент вариации составляет менее 5% во всем диапазоне процедуры.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Сгусток в образце, либо концентрированная слизь мешают выделению инфекционной ДНК и РНК.

СТАБИЛЬНОСТЬ

При температуре 5-25°C в течении 12 месяцев

При температуре 0-5°C в течении 18 месяцев

ФОРМАТЫ ВЫПУСКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов комплектуется в пяти форматах:

- формат «У»: набор реагентов для выделения ДНК и РНК из жидких и сухих биологических образцов, рассчитан на исследование 100 проб;

- формат «П»: набор реагентов для выделения ДНК паразитов, рассчитан на исследование 100 проб;

Формат «У» предназначен для проведения процедуры выделения ДНК и РНК как из жидких биологических жидкостей (цельная кровь, суспензии органов, клеточные культуры, смывы, моча, слюна и др.), так и из высушенных на бумажном носителе биологических жидкостей (сухие капли крови, сухие капли суспензии органов, сухие капли клеточных культур, сухие капли смывов, сухие капли мочи, сухие капли слюны и др.)

Формат «П» предназначен для проведения процедуры выделения ДНК паразитов (гельминты, микозы).

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV (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 проведении процедуры выделения нужно:

- исследуемые биологические образцы оценивать как инфекционно-опасные, организовывать хранение и работу в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»
- при работе с потенциально инфицированными биологическими образцами предпринимать соответствующие меры защиты: одевать спецодежду и средства индивидуальной защиты (резиновые перчатки, одноразовые халаты);
- все повреждения на руках заклеить лейкопластырем или водонепроницаемой повязкой;
- в лаборатории, где работают с потенциально опасным материалом, запрещается принимать пищу, пить, курить, брать руками контактные линзы;
- в случае загрязнения поверхностей кровью и другими биологическими жидкостями обработать их дезинфицирующими жидкостями;
- выделение НК должен проводиться в отдельно выделенном помещении зонированном как «Зона экстракции» или «Зона для выделения нуклеиновых кислот»;
- реагенты с истекшим сроком годности, а так же использованные реагенты следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;
- при каждом этапе работы использовать одноразовые наконечники для автоматических дозаторов, а при отборе биологических образцов использовать одноразовые наконечники с фильтром;
- используемые наконечники и одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»;
- набор реагентов готов к использованию данной инструкции. Применять набор реагентов строго по назначению;

- не использовать набор реагентов, при нарушении целостности его упаковки и при несоответствии внешнего вида реагентов описанию в инструкции;
- не использовать набор реагентов, если были нарушены условия транспортирования и хранения;
- беречь реагенты от прямых солнечных лучей;
- держать реагенты вдали от воспламеняющихся предметов;
- Опасности и риски, связанные с применением набора реагентов, которые могут произойти:
- аллергические реакции при вдыхании реагентов или при соприкосновении с кожей, слизистой;
- вред при приеме внутрь;

Причины возникновения опасностей и рисков, связанных с использованием набора реагентов и способствующие им факторы:

- неправильное или неосторожное использование набора реагентов;
- использование не по назначению;
- использование неквалифицированного/необученного персонала;
- несовместимость с расходными материалами / принадлежностями/другими медицинскими изделиями;

Защитные меры, предотвращающие возникновение опасностей и рисков:

- работу с набором реагентов проводить в строгом соответствии с инструкцией.

Воздействия набора реагентов на организм человека:

- канцерогенный эффект отсутствует;
- мутагенное действие отсутствует;
- репродуктивная токсичность отсутствует.

ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ПЕРСОНАЛА

К процедуре выделения НК с набором реагентов допускаются лица, прошедшие специальную стажировку в молекулярно-биологической лаборатории и обученные правилам работы в клинико-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»)

УТИЛИЗАЦИЯ

Набор реагентов с истекшим сроком годности следует утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Полипропиленовые пробирки завинчивающиеся или плотно закрывающиеся объемом 1,5 мл (Axugen, inc. или SSI, США)
2. Завинчивающиеся крышки к пробиркам (Axugen, inc. или SSI, США)

3. Флаконы полипропиленовые с завинчивающимися крышками (ООО «Меридианупак», Санкт-Петербург или ООО «Титан», Санкт-Петербург или ЗАО «Thermo Fisher Scientific», Санкт-Петербург).
4. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 50, до 200, до 1000 мкл (ЗАО Thermo Fisher Scientific, Санкт-Петербург)
5. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема без фильтра до 50, до 200, до 1000 мкл (ЗАО Thermo Fisher Scientific, Санкт-Петербург)
6. Штатив «рабочее место» для пробирок объемом 1,5 мл (ООО «БИОКОМ», Москва)
7. Штатив для дозаторов (ООО «Ленпипет»)
8. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А («БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия или аналогичный)
9. Микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 мл с максимальной скоростью 14 тыс. г (Eppendorf MiniSpin plus, Eppendorf, Германия или аналогичная).
10. Вортекс (Микроспин, BioSan, Латвия или аналогичные).
11. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100°C («Гном», «ДНК-технология», Москва или аналогичный).
12. Аспиратор (FTA-1, BioSan, Латвия или аналогичные).
13. Автоматические дозаторы переменного объема («Ленпипет», ЗАО «Thermo Fisher Scientific», Санкт-Петербург или аналогичные).
14. Холодильник от 2 до 8°C с морозильной камерой от минус 24 до минус 16°C.
15. Одноразовый халат, перчатки, обувь в соответствии с МУ 1.3.2569-09.
16. Пластиковые контейнеры для сброса (ЕК-01-КМ-Проект или аналогичный).

СОСТАВ

Набор реагентов для выделения ДНК и РНК из биологических образцов состоит:

Формат «У»: выделения ДНК и РНК из жидких и сухих образцов

Лизирующий буфер (Lyzing buffer)	– 1 флакон, 60 мл
Буфер ИЗО (buffer izo)	– 1 флакон, 50 мл
Отмывка (Washing)	– 1 флакон, 40 мл
Элюирующий буфер (Elution buffer)	– 1 флакон 7 мл
Инструкция	– 1 шт.
Паспорт	– 1 шт.

Формат «П»: выделения ДНК из паразитов

Лизирующий буфер 2 (Lyzing buffer 2)	– 1 флакон, 60 мл
Раствор 1 (solute1)	– 1 пробирка, 2 мл
Буфер ИЗО (buffer izo)	– 1 флакон, 50 мл
Отмывка (Washing)	– 1 флакон, 40 мл
Элюирующий буфер (Elution buffer)	– 1 флакон 7 мл
Инструкция	– 1 шт.
Паспорт	– 1 шт.

Так же прикладывается в каждый формат инструкцию по применению и паспорт проверки качества

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК И РНК

Подготовка к проведению процедуры

1. «Лизирующий буфер» (если хранился при температуре от 2 до 8° С) прогреть при температуре 65° С до полного растворения кристаллов, перемешать.
2. Подготовить и расставить в штатив пробирки на 1,5 мл.
3. Промаркировать их.

Протокол выделения из сухих образцов

1. Достать бумажный носитель УТК производства, производства ООО «Био среда», содержащую биологический образец (кровь, мазки и др.).
2. Если Вы используете сухие образцы (пятна крови), нанесенные на носитель в виде кругов, то нужно взять необходимое количество заранее простерилизованных компостеров (с диаметром 6 мм).
3. Используя для каждого образца отдельный компостер выбить в соответствующие пробирки круги с сухими пятнами крови. Для получения достаточного количества материала компостером необходимо вырезать одно целое пятно крови, последовательно совершая 4-5 вырезаний.
4. Если Вы используете сухие образцы, нанесенные на носитель, производства ООО «БИОКОМ», то разрезать ножницами сухой носитель сначала вдоль мембраны (полоски) до упаковки, затем опустить ее над пробиркой 1,5 мл разрезать на части размером примерно 0,5 см, так чтобы части мембраны опускались сразу в пробирку.
5. Добавить в пробирку 300 мкл дистиллированной воды.
6. Перемешать на вортексе в течение 30 сек.
7. Оставить пробирку в штативе при комнатной температуре на 10 мин. перемешивая на вортексе каждые 3 мин по 20 сек.
8. Перенести надосадочную жидкость в чистые пробирки.
9. В пробирку добавить 600 мкл Лизирующего буфера, Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе.
10. Инкубировать пробирки 10 мин при 65° С.
11. Центрифугировать пробирки 10 сек при 14 тыс. об/мин для сброса капель с крышки.
12. Внести в пробирку 500 мкл Буфера ИЗО (предварительно флакон с буфером тщательно перемешать).
13. Тщательно перемешать на вортексе в течении 40 сек.
14. Центрифугировать пробирки 7 мин при 14 тыс. об/мин.
15. Не захватывая осадок (очень маленькая «точка»), отобрать надосадочную жидкость.
16. Внести в пробирки по 400 мкл Отмывки.
17. Плотно закрыть крышки пробирок.
18. Осторожно перевернуть пробирки 7 раз. При этом осадок должен быть внизу

пробирки!!!

19. Центрифугировать пробирки при 14 тыс. об/мин в течении 2 мин.

20. Не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость.

21. Инкубировать пробирки 5 мин при 65° С с открытыми крышками.

22. Внести в пробирки по 50 мкл Элюирующего буфера. (Допускается увеличение объема до 70 мкл)

23. Закрыть крышки пробирок.

24. Перемешать на вортексе.

25. Поместить пробирки в термостат на 5 мин при 65° С. В течение которых 1 раз еще перемешать.

26. Центрифугировать пробирки 10 тыс. об/мин в течении 30 сек.

Пробы готовы к постановке ПЦР и реакции обратной транскрипции. ДНК и кДНК могут храниться при температуре от 2 до 8°С в течение недели, а при температуре от минус 24 до минус 16°С в течении года.

Протокол выделения из жидких образцов

1. Взять образец объемом 100 мкл и внести его в пробирку на 1,5 мл

2. В пробирку с жидким образцом добавить 300 мкл Лизирующего буфера.

3. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе.

4. Инкубировать пробирки 10 мин при 65° С.

5. Внести в пробирки 400 мкл Буфера ИЗО (предварительно флакон с буфером тщательно перемешать).

6. Тщательно перемешать на вортексе в течении 40 сек.

7. Центрифугировать пробирки 7 мин при 14 тыс. об/мин.

8. Не захватывая осадок (очень маленькая «точка»), отобрать надосадочную жидкость.

9. Внести в пробирки по 400 мкл Отмывки.

10. Плотно закрыть крышки пробирок.

11. Осторожно перевернуть пробирки 7 раз. При этом осадок должен быть внизу пробирки.

12. Центрифугировать пробирки при 14 тыс. об/мин в течении 2 мин.

13. Не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость.

14. Инкубировать пробирки 5 мин при 65° С с открытыми крышками.

15. Внести в пробирки по 50 мкл Элюирующего буфера. (Допускается увеличение объема до 70 мкл)

16. Закрыть крышки пробирок.

17. Перемешать на вортексе.

18. Поместить пробирки в термостат на 5 мин при 65° С. В течение которых 1 раз еще перемешать.

19. Центрифугировать пробирки 10 тыс. об/мин в течении 30 сек.

Пробы готовы к постановке ПЦР и реакции обратной транскрипции. ДНК и кДНК могут храниться при температуре от 2 до 8°С в течение недели, а при температуре от минус 24 до минус 16°С в течении года.

Протокол выделения из паразитов

1. Взять образец (кровь, суспензию) объемом 200 мкл и внести его в пробирку на 1,5 мл.
2. Если вы исследуете соскоб (микозы), то его внести в пробирку в объеме 0,5х0,5 см.
3. В пробирку с образцом добавить 500 мкл Лизирующего буфера.
4. Добавить 20 мкл Раствора 1.
5. Пробирки плотно закрыть, содержимое тщательно перемешать на вортексе.
6. Инкубировать пробирки 40 мин при 65° С, периодически перемешивая на вортексе (каждые 15 мин).
7. Внести в пробирки 400 мкл Буфера ИЗО.
8. Тщательно перемешать на вортексе в течении 40 сек.
9. Центрифугировать пробирки 7 мин при 14 тыс. об/мин.
10. Не захватывая осадок (очень маленькая «точка»), отобрать надосадочную жидкость вакуумным насосом.
11. Внести в пробирки к осадку 400 мкл Отмывки.
12. Плотно закрыть крышки пробирок.
13. Осторожно перевернуть пробирки 7 раз. При этом осадок должен быть внизу пробирки.
14. Центрифугировать пробирки при 14 тыс. об/мин в течении 2 мин.
15. Не захватывая осадок, отобрать надосадочную жидкость вакуумным насосом.
16. Инкубировать пробирки 5 мин при 65° С с открытыми крышками.
17. Внести в пробирки по 50 мкл Элюирующего буфера. (Допускается увеличение объема до 70 мкл)
18. Закрыть крышки пробирок.
19. Перемешать на вортексе 20 сек.
20. Поместить пробирки в термостат на 5 мин при 65° С. В течение которых 1 раз еще перемешать.
21. Центрифугировать пробирки 10 тыс. об/мин в течении 30 сек.

Пробы готовы к постановке ПЦР и реакции обратной транскрипции. ДНК и кДНК могут храниться при температуре от 2 до 8° С в течение недели, а при температуре от минус 24 до минус 16° С в течении года.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЕ

Хранение набора реагентов осуществляется при температуре 2-25 °С.

Набор реагентов транспортировать при температуре 2-25 °С.

Срок годности 12 месяцев. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора реагентов всем требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течении указанного срока годности при соблюдении всех условий хранения и транспортирования. Рекламация на Набор реагентов для выделения ДНК и РНК Универсальный направлять предприятию-производителю ООО «Биологическая среда» (127015, город Москва, улица Большая Новодмитровская д.23, стр.3), в отдел рекламаций (e-mail Jigon@mail.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции, при использовании набора реагентов, фактов, создающих вред здоровью рекомендуется направить информационное письмо в отдел по работе с рекламациями предприятия –производителя, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию (Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения РФ) в соответствии с законодательством РФ.

Согласовано

**Руководитель испытательной
Лаборатории**

ФИО

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СИМВОЛЫ НА УПАКОВКЕ И ЭТИКЕТКИ



производитель



дата изготовления



изделие для in vitro диагностики



обратитесь к инструкции по применению

