

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ реагентов для выделения нуклеиновых кислот «АртДНК Вет»

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот «АртДНК Вет» предназначены для экстракции суммарной РНК/ДНК из тканей животных и человека (в том числе всех видов клинического материала), растительного сырья, продуктов питания, биологических добавок, кормов и др. биологических образцов для последующего исследования методами ПЦР, ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени.

ХАРАКТЕРИСТИКА

Реагенты «АртДНК Вет» являются высокочувствительным набором, позволяющим одинаково эффективно выделять как РНК, так и ДНК из биологического материала. Лимит чувствительности составляет 5 геном-эквивалентов на выделение.

Метод очистки РНК/ДНК с использованием реагентов «АртДНК Вет» отличается высокой скоростью (время выделения 1 образца – не более 15 мин), простотой и удобством и не требует дополнительных реактивов.

Комплектация реагентов «АртДНК Вет» рассчитана на проведение 100 выделений (таблица 1).

Таблица 1. Комплектация реагентов «АртДНК Вет»

Компонент	Объем, не менее
1. ДНК-сорбент	1,0 мл
2. Сорбирующий раствор	30 мл
3. Промывочный раствор 1	30 мл
4. Промывочный раствор 2	30 мл
5. Элюирующий раствор	15 мл

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Метод выделения суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов «АртДНК Вет» основан на связывании нуклеиновых кислот с ДНК-сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера. Данный метод позволяет получать РНК/ДНК, пригодную для постановки ПЦР и ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией в режиме реального времени.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с реагентами «АртДНК Вет» необходимо соблюдать текущие ТНПА в области лабораторной ПЦР-диагностики.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный или ПЦР-бокс;
- твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл с возможностью термостатирования при 65 °С;
- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 12 000 об/мин;
- вортекс;
- набор дозаторов переменного объема;
- одноразовые наконечники с фильтром для дозаторов переменного объема;
- одноразовые закрывающиеся пробирки объемом 1,5 – 2,0 мл;
- штативы для пробирок и наконечников;
- холодильник от +2 °С до +8 °С, с морозильной камерой от -24 °С до -16 °С;
- отдельный халат и одноразовые перчатки;
- емкость для сброса наконечников;
- комплект средств для обработки рабочего места;

При работе с РНК необходимо использовать расходные материалы, имеющие специальную маркировку «RNase-free», «DNase-free».

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ

Взятие, транспортирование и хранение материала для исследования осуществляется в соответствии с существующими ТНПА, методическими рекомендациями и инструкциями.

Образцы мочи и БАЛ требуют предварительной обработки в соответствии с установленными методическими рекомендациями.

Все остальные образцы непосредственно перед выделением РНК/ДНК тщательно гомогенизируют на вортексе, капли материала с внутренней части крышки убирают кратковременным центрифугированием при минимальных скоростях.

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК НА ЦЕНТРИФУГЕ

Установить температуру на термостате 65 °С.

0. В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** и/или **Промывочный раствор 1** при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

I. В подходящей по объему емкости приготовить смесь, содержащую **Сорбирующий раствор, ДНК-сорбент и ВКО** (при его использовании), из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора, 10 мкл ДНК-сорбента и 10 мкл ВКО** на проведение одного выделения. Полученную смесь перемешать.

II. В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по **320 мкл приготовленной смеси** (по 310 мкл, если ВКО не используется).

III. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца** (см. подготовка исследуемого материала).

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.

IV. Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1 – 3 раза) перемешивании.

V. Осадить ДНК-сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**, удалить надосадочную жидкость.

VI. Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора 1** и перемешать на вортексе.

VII. Осадить ДНК-сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**, удалить надосадочную жидкость.

VIII. Добавить в каждую пробирку по **300 мкл Промывочного раствора 2** и перемешать на вортексе.

IX. Осадить ДНК-сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**, удалить надосадочную жидкость.

На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора 2 могут вызвать ингибирование ПЦР.

X. Добавить в каждую пробирку по **50 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.

XI. Инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1 – 3 раза) перемешивании.

XII. Осадить ДНК-сорбент в течение **30 сек** при **12 000 об/мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

Для хранения образцов рекомендуется перенести надосадочную жидкость в новые пробирки. Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше 4 °С или в течение 1 года при температуре не выше минус 16 °С.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка реагентов «АртДНК Вет» осуществляется при температуре +2 – +25 °С на протяжении всего срока годности или при температуре +25 – +37 °С (до 5 суток). Реагенты «АртДНК Вет» транспортируются любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих их сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Реагенты «АртДНК Вет» хранятся в упаковке изготовителя при температуре +2 – +25 °С.

Срок годности комплекта «АртДНК Вет» – 12 месяцев с даты изготовления.