

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

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот «АртМагнит Вет» предназначены для экстракции суммарной РНК/ДНК из биологического и патологического материала (крови, сыворотки, фекалий, фрагментов тканей и органов), культуры микроорганизмов, растительного сырья, продуктов питания, продуктов свиного происхождения (полуфабрикаты, фарш, сосиски, колбасы и др.), 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 «АртМагнит Вет» являются высокочувствительным набором, позволяющим одинаково эффективно выделять как РНК, так и ДНК из биологического материала. Лимит чувствительности составляет 5 геном-эквивалентов на выделение.

Реагенты «АртМагнит Вет» позволяют проводить очистку РНК/ДНК как в ручном режиме (на магнитном штативе или с применением центрифуги), так и в автоматическом режиме с использованием любых открытых роботизированных станций (производства Beckman Coulter Inc., Eppendorf International, Thermo Fisher Scientific, Hamilton, Tecan, Aurora Biomed Inc., BioTeke Corporation (Wuxi) Co., Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd (Auto-Pure 96), Yantai Addcare BioTech Co., Ltd. (Nexor 96) и др.

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

Комплектация реагентов «АртМагнит Вет» рассчитана на проведение 100 выделений и представлена в таблице 1.

Таблица 1. Комплектация реагентов «АртМагнит Вет»

Компонент	Объем, не менее
1. Магнитный 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 «АртМагнит Вет» основан на связывании нуклеиновых кислот с магнитным 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 «АртМагнит 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;
- магнитный штатив (при его использовании);
- 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;
- автоматизированная станция (при ее использовании).

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.

Образцы крови не требуют предварительной обработки.

Образцы культуры микроорганизмов: для выделения использовать 10^4 – 10^{10} клеток бактерий, ресуспендированных в физиологическом растворе или фосфатно-солевом буфере.

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 МАГНИТНОМ ШТАТИВЕ

Установить температуру на термостате 65°C.

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, Магнитный сорбент и ВКО** (при его использовании), из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора, 10 мкл Магнитного 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°C** при постоянном (рекомендуется) или периодическом (1 – 3 раза) перемешивании.

V. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

VI. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30 – 60 сек.** Не затрагивая магнитный сорбент аккуратно удалить надосадочную жидкость.

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

VIII. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

IX. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30 – 60 сек.** Аккуратно не затрагивая магнитный сорбент удалить надосадочную жидкость.

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

XI. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

XII. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30 – 60 сек.** Аккуратно не затрагивая магнитный сорбент 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.

XIII. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе.

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

XV. Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

XVI. Перенести пробирки на магнитный штатив на **30 – 60 сек.** 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.

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**, **Магнитный сорбент** и **ВКО** (при его использовании), из расчета **300 мкл Сорбирующего раствора**, **10 мкл Магнитного 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 магнитный 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 магнитный 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 магнитный 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 **100 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 магнитный 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.

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК НА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СТАНЦИИ

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

I. В **Сорбирующий раствор** внести **Магнитный сорбент** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе).

II. Разнести по лункам 1-го планшета **Сорбирующий раствор** с **Магнитным сорбентом** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе) по **310 мкл** (или 320 мкл, если используется ВКО).

III. Разнести по лункам 2-го планшета **Промывочный раствор 1** по **300 мкл**.

IV. Разнести по лункам 3-го планшета **Промывочный раствор 2** по **300 мкл**.

V. Разнести по лункам 4-го планшета **Элюирующий раствор** по **100 мкл**.

VI. В каждую лунку планшета с **Сорбирующим раствором** и **Магнитным сорбентом** и **ВКО** (если оно используется в тест-системе) добавить по **100 мкл образца** (см. подготовка исследуемого материала). При необходимости в лунку для ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 100 мкл Элюирующего раствора.

VII. Установить все планшеты в прибор.

VIII. Запрограммировать прибор:

А) Инкубация образца в **Сорбирующем растворе** и **Магнитном сорбенте** течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном перемешивании;

Б) Инкубация образца в **Промывочном растворе 1** в течение **2 мин** без термостатирования при постоянном перемешивании;

В) Инкубация образца в **Промывочном растворе 2** в течение **2 мин** без термостатирования при постоянном перемешивании;

Г) Инкубация образца в **Элюирующем растворе** в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном перемешивании;

Д) Собрать магнитный сорбент и сбросить гребенку для магнитных стержней.

IX. Запустить программу экстракции.

Х. После окончания работы прибора планшет с **Элюирующим раствором** извлечь. **Элюирующий раствор** 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 «АртМагнит Вет» осуществляется при температуре +2 – +25°С на протяжении всего срока годности или при температуре +25 – +37 °С (до 5 суток). Реагенты «АртМагнит Вет» транспортируются любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих их сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Реагенты «АртМагнит Вет» хранятся в упаковке изготовителя при температуре +2 – +25°С. Срок годности комплекта «АртМагнит Вет» – 12 месяцев с даты изготовления.