

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

### НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот «АртМагнит РНК» предназначены для экстракции суммарной РНК/ДНК из биологического материала: мазков, соскобов и отделяемого слизистых оболочек урогенитального, респираторного и пищеварительного трактов (в том числе мазков из носоглотки и ротоглотки) и проб из ОСОЧ для последующего исследования методами ПЦР, ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени.

### ХАРАКТЕРИСТИКА

Реагенты «АртМагнит РНК» 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 РНК» 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 РНК» отличается высокой скоростью (время выделения 1 образца – не более 15 мин), простотой и удобством и не требует дополнительных реактивов.

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

**Таблица 1. Комплектация реагентов «АртМагнит РНК»**

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

### ПРИНЦИП РАБОТЫ

Метод выделения суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов «АртМагнит РНК» основан на связывании нуклеиновых кислот с магнитным сорбентом в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевой буфер. 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 РНК» 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.

Все 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 °С.

**0.** В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** 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.** 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** 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. *На данном этапе необходимо как можно тщательнее отобрать надосадочную жидкость, так как в дальнейшем остатки Промывочного раствора 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.** Кратковременным центрифугированием осадить капли жидкости со стенок пробирок.

**XIII.** 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** 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** и перемешать на вортексе.

**VII.** 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 могут вызвать ингибирование ПЦР.*

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

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

**X.** 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 -16 °С.*

### **ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК НА АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ СТАНЦИИ**

**0.** В случае выпадения осадка прогреть **Сорбирующий раствор** 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** по **300 мкл**.

**IV.** Разнести по лункам 3-го планшета **Элюирующий раствор** по **100 мкл**.

**V.** 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 ОКЭ (отрицательный контрольный образец, поставляется вместе с тест-системами).*

**VI.** Установить все планшеты в прибор.

**VII.** Запрограммировать прибор:

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

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

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

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

**VIII.** Запустить программу экстракции.

**IX.** После окончания работы прибора, планшет с Элюирующим раствором извлечь. Элюирующий раствор содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

*Допускается хранение образцов в течение суток при температуре не выше +4 °С или в течение 1 года при температуре не выше -16 °С.*

### **ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ**

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

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