

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ реагентов для выделения нуклеиновых кислот «АртНК Экстракт ВД»

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот «АртНК Экстракт ВД» предназначены для экстракции суммарной РНК/ДНК из биологического и патологического материала (крови, сыворотки, спермы, фекалий, фрагментов тканей и органов), культуры микроорганизмов, 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 «АртНК Экстракт ВД» позволяют одинаково эффективно выделять как РНК, так и ДНК из широкого спектра биологического материала. Лимит чувствительности составляет 5 геном-эквивалентов на выделение.

Метод выделения РНК/ДНК с использованием реагентов «АртНК Экстракт ВД» отличается простотой и удобством и не требует дополнительных реактивов.

Комплектация реагентов «АртНК Экстракт ВД» рассчитана на проведение 100 выделений (таблица 1).

Таблица 1. Состав комплекта «АртНК Экстракт ВД»

Компонент	Объем, не менее
1. Высаливающий раствор	30 мл
2. Осаждающий раствор	110 мл
3. Промывочный раствор	100 мл
4. Элюирующий раствор	15 мл

ПРИНЦИП РАБОТЫ

Метод очистки суммарной РНК/ДНК с использованием реагентов «АртНК Экстракт ВД» основан на осаждении нуклеиновых кислот спиртовым раствором с последующей промывкой осадка для удаления нежелательных примесей и растворением в буфере с низкой ионной силой. Данный метод позволяет быстро получать РНК/ДНК, пригодную для постановки ПЦР и ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с реагентами «АртНК Экстракт ВД» 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 минус 24 °С до минус 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.

Жидкие маловязкие образцы (например, плазма, сыворотка) используются без дополнительных манипуляций. Не допускается использование образцов, содержащих гепарин.

Жидкие вязкие образцы (сперма, особо вязкие соскобы и мазки) разводят в 4 раза физиологическим раствором, центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант используют для последующего выделения РНК/ДНК.

Из проб тканей, органов, продуктов питания и др. твердых образцов готовят 10 %-ную суспензию на дистиллированной/деионизованной воде или физиологическом растворе с использованием ручного или автоматического гомогенизатора. Полученный экстракт центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 1 мин. Супернатант используют для последующего выделения РНК/ДНК. Допускается хранение полученного экстракта в течение 3 месяцев при температуре не выше минус 16 °С (при необходимости повторного анализа). После размораживания образца необходимо повторить процедуру центрифугирования.

ВЫДЕЛЕНИЕ РНК/ДНК

Установить температуру на термостате 65 °С.

0. В случае выпадения осадка в **Высаливающем и/или Осаждающем растворах** растворить кристаллы интенсивным встряхиванием, допускается прогревание раствора до температуры 37 °С для лучшего растворения кристаллов.

I. В каждую пробирку внести по **300 мкл Высаливающего раствора** и по **10 мкл ВКО** (при его использовании).

II. Добавить в каждую пробирку по **100 мкл образца** (см. Подготовка исследуемого материала).

При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), добавить 100 мкл Элюирующего раствора или ОКО (отрицательного контрольного образца). ОКЭ рекомендуется ставить при каждой постановке выделения.

III. Содержимое перемешать на вортексе и инкубировать в течение **5 мин** при температуре **65 °С**.

IV. Добавить в пробирки по **600 мкл Осаждающего раствора**, перемешать на вортексе в течение 10 с, инкубировать 30 с при комнатной температуре.

V. Центрифугировать в течение **5 мин** при **12 000 об/мин**.

VI. Не задевая осадок аккуратно **удалить надосадочную жидкость**.

VII. Добавить в пробирки по **500 мкл Осаждающего раствора**, промыть осадок, переворачивая пробирки 3 – 5 раз.

VIII. Центрифугировать в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**.

IX. Не задевая осадок аккуратно **удалить надосадочную жидкость**

X. Внести в пробирки с осадком по **1 000 мкл Промывочного раствора**, плотно закрыть крышки, осторожно промыть осадок, переворачивая пробирки 3–5 раз.

XI. Центрифугировать в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**.

XII. Не задевая осадок аккуратно **удалить надосадочную жидкость**, используя отдельный наконечник для каждой пробы. Для наилучшего удаления надосадочной жидкости рекомендуется: дать пробе постоять при комнатной температуре в течение 30–60 с и отобрать отстоявшуюся надосадочную жидкость повторно.

XIII. Инкубировать пробирки с открытыми крышками в термостате в течение **5 мин** при температуре **65 °С** для подсушивания осадка.

XIV. Добавить в пробирки по **50 мкл Элюирующего раствора**, перемешать на вортексе. При необходимости, допускается увеличение объема Элюирующего раствора до 150 мкл.

XV. Инкубировать пробы в термостате в течение **5 мин** при температуре **65 °С** при постоянном (рекомендуется) или периодическом перемешивании. Допускается краткосрочное перемешивание на вортексе.

XVI. Центрифугировать пробирки в течение **1 мин** при **12 000 об/мин**. Надосадочная жидкость содержит очищенные РНК и ДНК, готовые для постановки обратной транскрипции и ПЦР.

XVII. 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

Транспортировку реагентов «АртНК Экстракт ВД» осуществляют при температуре окружающей среды (но не более 30°C) в течение трех суток. Реагенты «АртНК Экстракт ВД» транспортируют любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих их сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

При получении разукomплектовывают в соответствии с указанными температурными режимами хранения. Высаливающий раствор хранят при температуре не выше -16°C, остальные компоненты хранят в упаковке изготовителя при температуре +2 – +25 °C.

Срок годности комплекта реагентов «АртНК Экстракт ВД» – 12 месяцев с даты изготовления.