«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
АО «Вектор-Бест»
_____ М.Д. Хусаинов
«28» _____ 2021 г.
м.п.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выделения ДНК
из цельной крови человека и соскобов буккального эпителия
«РеалБест-Генетика ДНК-экспресс»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» (далее по тексту – набор) предназначен для выделения ДНК из цельной крови человека и соскобов буккального эпителия.

1.2. Набор может быть применен в клинической и научно-исследовательской практике при проведении генетических исследований методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

1.3. Набор рассчитан на выделение ДНК из 50 образцов, включая контрольные образцы.

1.4. Набор предназначен для применения с наборами для определения однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций серии «РеалБест-Генетика».

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Принцип действия набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс» состоит в отмывке, при которой происходит разрыв клеточной мембраны эритроцитов (образцы буккального эпителия процедуру отмывки не проходят), и температурной обработке пробы многокомпонентным лизирующим раствором, разрушающим комплекс нуклеиновых кислот с белками. После этого проба готова к постановке ПЦР.

В состав ПЦР-наборов серии «РеалБест-Генетика» входят контрольные образцы КО1 и КО2. КО1 и КО2 должны проходить процедуру выделения наравне с биологическими пробами (КО1 и КО2 процедуру отмывки не проходят).

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

– раствор для отмывки – 2 флакона (по 28 мл);

– лизирующий раствор – 1 флакон (17 мл).

3. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

3.1. Эффективность выделения ДНК человека по стандартному образцу предприятия (СОП 05-2-522, содержащий 10^4 клеток буккального эпителия/мл, что соответствует $2x10^4$ копий гена HMBS) – 100%. Контроль эффективности выделения ДНК человека проводится по пяти повторам выделения из СОП. Эффективность составляет 100% при условии, что все пять образцов определяются как положительные.

3.2. Эффективность выделения ДНК, определенная на 70 положительных образцах цельной крови человека и соскобов буккального эпителия - 100% (интервал 96%-100%, с доверительной вероятностью 90%);

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Внимание! **Несоблюдение описанных ниже требований может привести к искажению результатов ПЦР.**

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 1 (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. При работе с клиническим материалом следует соблюдать СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности *(опасности)* и возбудителями паразитарных болезней».

4.3. Для предотвращения контаминации необходимо территориально разделять этапы выделения ДНК и постановки ПЦР согласно МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые медицинские перчатки.

4.5. Каждое рабочее место должно быть снабжено собственным набором пипеток переменного объема, необходимыми вспомогательными материалами и оборудованием. Запрещается их перемещение между рабочими местами.

4.6. Выделение ДНК следует проводить в ламинарных боксах II класса защиты с включенным ламинарным потоком.

4.7. Для выделения ДНК необходимо использовать только одноразовые наконечники с фильтром для пипеток.

4.8. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке разных образцов биологического материала.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

4.9. После окончания работ для предотвращения контаминации рабочие поверхности ламинарных боксов и лабораторных столов следует подвергнуть действию бактерицидных УФ ламп в течение 1 часа. Затем обработать регламентированными санитарными правилами дезинфицирующими средствами (такими, как: 0,2% раствор «ДП-2Т»; 1-3% раствор «Диабак»; 0,5% раствор «Лизафин»; 0,5-1% раствор «Мистраль»; 0,5-2% раствор «Велтолен»).

4.10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.

4.11. Утилизацию или уничтожение, дезинфекцию наборов реагентов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

– ламинарный бокс 2 класса биологической защиты (бокс абактериальной воздушной среды типа БАВп-01-«Ламинар-с», фирма Ламинарные системы, Россия);

– холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 8 °С;

– микроцентрифуга типа «Eppendorf» с максимальной скоростью вращения не ниже 8000 об/мин (центрифуга «MiniSpin», фирма Eppendorf, Германия);

– встряхиватель для пробирок вихревой типа «Вортекс» («Bio-Vortex V-1 plus», фирма BioSan, Латвия);

– термостат, обеспечивающий нагрев до 98 °С («Thermo Shaker TS-100 с блоком SC20N», фирма BioSan, Латвия или аналогичный);

– пипетки полуавтоматические (дозаторы механические) одноканальные с переменным объёмом, со сменными наконечниками («Biohit», Финляндия);

– перчатки медицинские одноразовые, нестерильные, неопудренные, латексные или неопреновые (перчатки «NeoTouch», «Ansell HealthCare», Германия);

– одноразовые наконечники для пипеток с защитным фильтром /аэрозольным барьером (фирма «FinnTip», Финляндия);

– отсасыватель медицинский («В-40» ВИСМА-ПЛАНАР, Россия);

− одноразовые пробирки вместимостью 2 мл (фирма Sarstedt, Германия, кат. № 72.690.001);

− штативы для микропробирок вместимостью 2 мл («Хеликон», Россия);

– контейнер с дезинфицирующим раствором («Контейнер для сбора острого инструментария – ЕК-01», «КМ-Проект», Россия).

6. ПОДГОТОВКА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ И РЕАГЕНТОВ

6.1. Подготовка образцов цельной крови.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Внимание! Не допускается применение для анализа образцов гепаринизированной крови.

Кровь забирается в вакуумную пробирку с ЭДТА. После забора крови её необходимо плавными движениями перемешать с антикоагулянтом, находящимся в пробирке.

Транспортировать и хранить образцы следует:

– при температуре (18–25) °С не более 2 часов;

– при температуре (2–8) °С не более 1 недели;

– при температуре минус (18-60) °С не более 1 месяца.

Повторное замораживание-оттаивание цельной крови не допустимо!

6.2. Подготовка образцов буккального эпителия.

Исследуемый материал, забранный с помощью одноразовых стерильных зондов, перенести в пробирку с транспортным раствором *(из наборов производства ЗАО «Вектор-Бест»)*. Тщательно перемешать. Оставить зонд в пробирке, надломив в зоне насечки, либо извлечь зонд, предварительно отжав остатки жидкости о стенки пробирки *(использованный зонд выбросить в контейнер с дезинфицирующим раствором)*, пробирку плотно закрыть. Проба готова к процедуре выделения *(п. 7.3)*.

Транспортировать и хранить образцы следует:

– при температуре (18–25) °С не более 2 суток;

– при температуре (2–8) °С не более 2 недель;

– при температуре минус (18-60) °С не более 2 месяцев.

7. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

7.1. Перед началом работы необходимо достать набор из холодильника и выдержать при температуре (18–25) °С не менее 30 мин.

Извлечь из набора для ПЦР серии «РеалБест-Генетика» пробирки с КО1 и КО2 и флакон с элюирующим раствором «Генетика».

7.2. Выделение ДНК из образцов цельной крови.

7.2.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству анализируемых образцов)*. Установить их в штатив.

7.2.2. В каждую пробирку внести по 1 мл раствора для отмывки.

7.2.3. Цельную кровь перемешать до гомогенного состояния путём переворачивания пробирок *(не вортексировать!)*.

7.2.4. В каждую пробирку пипеткой с отдельными наконечниками внести по 50 мкл анализируемых образцов цельной крови в соответствии с маркировкой пробирок.

7.2.5. Пробирки плотно закрыть крышками и перемешать содержимое пробирок переворачиванием *(не вортексировать!)*.

7.2.6. Центрифугировать при 7000 об/мин в течение 3 мин.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

7.2.7. Из каждой пробирки аккуратно отобрать надосадочную жидкость пипеткой *(или отсасывателем)* с отдельным наконечником, не задевая осадок.

7.2.8. Добавить и подписать ещё 2 пробирки: КО1 и КО2.

7.2.9. В пробирку, маркированную «КО1», внести 30 мкл КО1.

7.2.10. В пробирку, маркированную «КО2», внести 30 мкл КО2.

Далее продолжить процедуру выделения ДНК с п.7.4.

7.3. Выделение ДНК из образцов буккального эпителия

7.3.1. Отобрать и подписать необходимое для работы количество пробирок объёмом 2 мл *(по количеству анализируемых образцов плюс 2 пробирки для КО1 и КО2).* Установить их в штатив.

7.3.2. В пробирки, кроме «КО1» и «КО2», внести по 100 мкл пробы*, используя наконечники с аэрозольным барьером.

**Перед внесением пробы аккуратным пипетированием ресуспендировать осадок из клеток, полученный в пробирке с транспортной средой, чтобы в выделение попала суспензия клеток. Не захватывать комки слизи.*

7.3.3. Для контроля в пробирку, маркированную «КО1», внести 30 мкл КО1.

7.3.4. Для контроля в пробирку, маркированную «КО2», внести 30 мкл КО2.

7.4. В каждую пробирку к осадку *(при выделении из образцов цельной крови),* к суспензии клеток *(при выделении из образцов буккального эпителия)* или к раствору контрольных образцов *(в пробирках «КО1» и «КО2»)* добавить по 300 мкл лизирующего раствора. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10–15 сек. Выдержать в термошейкере при 98 °С с частотой вращения 250 об/мин в течение 15 мин.

7.5. После прогрева пробирки необходимо охладить до комнатной температуры, коротким центрифугированием сбросить капли со стенок пробирок.

7.6. В каждую пробирку добавить по 400 мкл элюирующего раствора «Генетика» *(является компонентом ПЦР-наборов серии «РеалБест-Генетика»).*

7.7. Перемешать содержимое пробирок на вортексе в течение 10−15 сек.

7.8. Центрифугировать пробирки в течение 1 мин при 13000 об/мин.

Пробы готовы к постановке ПЦР-анализа.

Внимание! Выделенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С не более 24 часов.

8. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА

8.1. Транспортирование набора должно проводиться при температуре (2–8) °С. Допускается транспортирование при температуре до 25 °С не более 10 суток.

8.2. Хранение набора в упаковке предприятия-изготовителя должно проводиться при температуре (2–8) °С в течение всего срока годности. Замораживание компонентов набора не допускается.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

8.3. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению набора.

9. ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

9.1. Производитель гарантирует соответствие выпускаемых изделий требованиям нормативной и технической документации.

Безопасность и качество изделия гарантируются в течение всего срока годности.

9.2. Производитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

9.3. Производитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями и настоящей инструкцией по применению.

Срок годности набора – 12 месяцев со дня выпуска.

По вопросам, касающимся качества набора «РеалБест-Генетика ДНК-экспресс», следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово, Научно-производственная зона, корп.36, комн.211, тел. (383) 227-67-64, тел./факс (383) 363-13-46.

E-mail: vbobtk@vector-best.ru

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru