

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ реагентов для колоночного выделения НК «АртMiniSpin Эксперт»

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот (НК) «АртMiniSpin Эксперт» предназначены для экстракции суммарной ДНК/РНК из клинического материала, содержащего малое количество НК (вплоть до одиночных копий): кровь, пятна крови, ФТА-карты, слюна, моча, сперма, пятна спермы, другие биологические жидкости, волосы, ногти, зубы, кости, жевательная резинка, сигареты, мазки и прочее, для последующего исследования методами ПЦР, ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени.

Реагенты «АртMiniSpin Эксперт» также могут быть использованы для выделения ДНК/РНК из образцов с высоким содержанием НК (животные и растительные ткани, микроорганизмы, культуры клеток, продукты питания и прочее).

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАГЕНТОВ

Реагенты «АртMiniSpin Эксперт» выпускаются в 2 комплектациях (таблица 1).

Таблица 1. Комплектации реагентов «АртMiniSpin Эксперт»

Комплектация	Состав
Комплектация 1	– Mini Spin колонки – 50 шт; – Гомогенизирующий раствор – 15 мл; – Лизирующий раствор – 0,5 мл; – Сорбирующий раствор – 40 мл; – Промывочный раствор – 50 мл; – Элюирующий раствор – 15 мл.
Комплектация 2	– Mini Spin колонки – 50 шт; – Гомогенизирующий раствор – 15 мл; – Лизирующий раствор – 0,5 мл; – Сорбирующий раствор – 40 мл; – Промывочный раствор – 50 мл; – Элюирующий раствор – 15 мл; – Пробирки – 150 шт.

ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Метод выделения ДНК/РНК реагентами «АртMiniSpin Эксперт» основан на лизисе образцов раствором, содержащим прстеиназу К, сорбции высвободившихся НК на поверхности мембраны Mini Spin колонки в присутствии хаотропных солей и их последующей элюции, что позволяет получать НК высокой степени чистоты свободные от низкомолекулярных соединений, белков, ингибиторов ПЦР и прочих нежелательных компонентов.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- ламинарный или ПЦР-бокс;
- твердотельный термостат для пробирок объемом 1,5 – 2 мл с возможностью термостатирования при 56 – 70 °С;
- микроцентрифуга для пробирок объемом 1,5 и/или 2 мл со скоростью вращения не менее 10 000 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;
- этанол;
- 1М ДТТ (для образцов волос, ногтей, спермы).

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Биологические жидкости, мазки, соскобы: берутся «как есть».

Пятна биологических жидкостей: вырезаются пятна диаметром 3 – 10 мм.

Волосы, ногти: используется фрагмент длиной 0,5 – 1 см, наличие луковицы значительно повышает выход целевой ДНК/РНК.

Зубы, кости: перемалываются как можно мельче с помощью специальных мельниц, гомогенизаторов, жидкого азота или др. методов.

Жевательная резинка: используется образец массой около 10 – 50 мг.

Сигареты: отрезается фрагмент площадью 0,5 – 2 см² от бумаги, покрывающей конец фильтра.

Прочие твердые образцы (животные и растительные ткани, продукты питания и др.): берется образец массой около 1 – 20 мг.

ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ КРОВИ, СЛЮНЫ

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести 1–100 мкл. образца.

II. К образцу добавить по 100 мкл Гомогенизирующего и Сорбирующего растворов и 10 мкл Лизирующего раствора.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 50 мкл этанола (96 – 100%), перемешать на вортексе и инкубировать 2 – 3 мин. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

V. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VI. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. Повторить п. VII.

IX. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

X. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но снижению концентрации НК в конечном образце),

инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода ДНК/РНК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 56 – 70 °С.

XI. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ МАЗКОВ И СОСКОБОВ

I. В пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести образец.

II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора, 20 мкл 1М ДТТ и 10 мкл Лизирующего раствора.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.

V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

XII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ МОЧИ

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести 1 – 1,4 мл. образца. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 3 мин. Супернатант удалить.

II. К осадку добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора, 10 мкл Лизирующего раствора и 20 мкл 1М ДТТ.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора, инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании.

V. Внести 50 мкл этанола (96 – 100 %), перемешать на вортексе и инкубировать 2–3 мин. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

XII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше минус 16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ НК ИЗ СПЕРМЫ И ПЯТЕН СПЕРМЫ

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести образец объемом 1 – 20 мкл или диаметром 3 – 10 мм (для пятен).

II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора, 10 мкл Лизирующего раствора и 20 мкл 1М ДТТ.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.

V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

ХП. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ПЯТЕН КРОВИ

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести образец диаметром 3 – 10 мм.

II. К образцу добавить 100 мкл Гомогенизирующего раствора и 10 мкл Лизирующего раствора.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 200 мкл Сорбирующего раствора.

V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

ХП. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ВОЛОС И НОГТЕЙ

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести образец длиной 0,5 – 1 см.

II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора, 20 мкл 1М ДТТ и 10 мкл Лизирующего раствора.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.

V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

XII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЗУБОВ, КОСТЕЙ И ПРОЧИХ ТВЕРДЫХ ОБРАЗЦОВ (В ТОМ ЧИСЛЕ МЯГКИХ ТКАНЕЙ)

I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести предварительно измельченный образец массой 1 – 20 мг.

II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора и 10 мкл Лизирующего раствора.

III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.

IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.

V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.

VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.

IX. Повторить п. VIII.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

XI. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

XII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше - 16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ ЖЕВАТЕЛЬНОЙ РЕЗИНКИ

- I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести предварительно измельченный образец массой 10 – 50 мг.
 - II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора и 10 мкл Лизирующего раствора.
 - III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 3 – 4 ч при периодическом перемешивании.
 - IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.
 - V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании.
 - VI. Внести 150 мкл этанола (96 – 100 %), перемешать на вортексе и инкубировать 2 – 3 мин. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.
 - VII. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
 - VIII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
 - IX. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
 - X. Повторить п. IX.
 - XI. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.
 - XII. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.
 - XIII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.
- «Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ СИГАРЕТ

- I. В пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести 0,5 – 2 см² бумаги, покрывающей конец фильтра.
- II. К образцу добавить 300 мкл Гомогенизирующего раствора и 10 мкл Лизирующего раствора.
- III. Инкубировать в термостате при температуре 56 °С в течение 60 мин при периодическом перемешивании.
- IV. Внести 300 мкл Сорбирующего раствора.
- V. Инкубировать в термостате при температуре 70 °С в течение 10 мин при периодическом перемешивании, центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 5 мин.
- VI. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
- VII. В колонку внести 500 мкл Сорбирующего раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
- VIII. В колонку внести 500 мкл Промывочного раствора. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. «Проскок» удалить.
- IX. Повторить п. VIII.

Х. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

ХІ. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 50 мкл Элюирующего раствора (увеличение объема Элюирующего раствора приводит к повышению суммарного выхода ДНК/РНК, но уменьшению ее концентрации в конечном образце), инкубировать 1 – 3 мин. Для наибольшего выхода НК рекомендуется предварительно подогреть Элюирующий раствор до температуры 60 – 65 °С.

ХІІ. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

«Проскок» содержит очищенную ДНК/РНК. Рекомендуется хранить выделенные НК при температуре не выше -16 °С.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка реагентов «АртMiniSpin Эксперт» осуществляется при температуре окружающей среды (но не более 30 °С) в течение трех суток. Реагенты «АртMiniSpin Эксперт» 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. Лизирующий раствор хранят при температуре не выше -16°С, остальные компоненты «АртMiniSpin Эксперт» хранят в упаковке изготовителя при температуре +15 – +25 °С. Допускается хранение всех компонентов набора, кроме Лизирующего раствора, при комнатной температуре в течение всего срока годности.

Срок годности реагентов «АртMiniSpin Эксперт» – 12 месяцев с даты изготовления.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ реагенты для выделения ДНК «АртДНК экспресс»

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для выделения ДНК «АртДНК экспресс» предназначены для экстракции ДНК из тканей животных и человека (в том числе всех видов клинического материала), растительного сырья, продуктов питания, биологических добавок, кормов и др. биологических образцов с целью проведения последующих молекулярно-биологических исследований методами ПЦР и ПЦР-РВ.

ХАРАКТЕРИСТИКА

Реагенты «АртДНК экспресс» выпускаются в 4 комплектациях (таблица 1).

Таблица 1. Комплектации реагентов «АртДНК экспресс»

Комплектация	Состав
Комплектация 1	Экспресс реагент – 1,0 мл
Комплектация 2	Экспресс реагент – 2,0 мл
Комплектация 3	Экспресс реагент – 10,0 мл
Комплектация 4	Экспресс реагент – 20,0 мл

ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Метод выделения ДНК реагентами «АртДНК экспресс» основан на сорбции ингибиторов ПЦР Экспресс реагентом, что позволяет быстро получать ДНК, пригодную для постановки ПЦР.

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;

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ

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

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

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

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК

0. Перед использованием Экспресс реагент необходимо ресуспендировать. В случае формирования осадка Экспресс реагента при его раскапывании по пробиркам, ресуспендирование необходимо повторить.

1. В каждую пробирку объемом 1,5 или 2 мл внести по 20 мкл Экспресс реагента и по 5 мкл экзотенного внутреннего контроля (ВКО) при его использовании.

II. В пробирки, содержащие Экспресс реагент, отдельными наконечниками с фильтрами внести по 25 мкл исследуемых образцов (см. подготовка исследуемого материала к экстракции). При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), внести 25 мкл отрицательного контрольного образца (ОКО); в пробирку ПКЭ (положительный контроль экстракции) внести 25 мкл положительного контрольного образца (ПКО).

III. Пробы перемешать на вортексе и инкубировать при температуре 95 °С в течение 5 мин при постоянном интенсивном перемешивании.

IV. Осадить Экспресс реагент при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочная жидкость содержит ДНК, готовую для постановки ПЦР. Для длительного хранения образцов рекомендуется перенести супернатант в новые пробирки.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка реагентов осуществляется при температуре окружающей среды, но не выше +37°С (до 5 суток) или при температуре +2 – +8 °С. Допускается транспортировка любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Реагенты хранятся в упаковке изготовителя при температуре от +2 °С до +8°С.

Срок годности реагентов для выделения ДНК «АртДНК экспресс» – 12 месяцев с даты изготовления.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ реагентов для колоночного выделения РНК «АртРНК MiniSpin»

НАЗНАЧЕНИЕ

Реагенты для колоночного выделения РНК «АртРНК MiniSpin» предназначены для экстракции суммарной РНК/ДНК из клинического материала: мазков, соскобов и отделяемого слизистых оболочек урогенитального, респираторного и пищеварительного трактов, лейкоцитарной фракции цельной крови, а также из биологических жидкостей (мочи, эякулята, секрета простаты, плазмы, сыворотки, слюны, отделяемого конъюнктивы, ликвора, плевральной, синовиальной и амниотической жидкостей, БАЛ) для последующего исследования методами ПЦР, ОТ-ПЦР, в том числе с детекцией результатов в режиме реального времени.

ХАРАКТЕРИСТИКА

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

Метод очистки РНК/ДНК с использованием реагентов «АртРНК MiniSpin» отличается высокой скоростью, простотой и удобством и не требует дополнительных реактивов.

Реагенты «АртРНК MiniSpin» выпускаются в 4 комплектациях (таблица 1).

Таблица 1. Комплектации реагентов «АртРНК MiniSpin»

Комплектация	Состав
Комплектация 1	- Mini Spin колонки – 50 шт; - Сорбирующий раствор – 50 мл; - Промывочный раствор – 65 мл; - Элюирующий раствор – 15 мл.
Комплектация 2	- Mini Spin колонки – 50 шт; - Сорбирующий раствор – 50 мл; - Промывочный раствор – 65 мл; - Элюирующий раствор – 15 мл; - Пробирки – 150 шт.
Комплектация 3	- Mini Spin колонки – 100 шт; - Сорбирующий раствор – 100 мл; - Промывочный раствор – 130 мл; - Элюирующий раствор – 15 мл.
Комплектация 4	- Mini Spin колонки – 100 шт; - Сорбирующий раствор – 100 мл; - Промывочный раствор – 130 мл; - Элюирующий раствор – 15 мл; - Пробирки – 300 шт.

ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Метод выделения РНК/ДНК реагентами «АртРНК MiniSpin» основан на принципе связывания нуклеиновых кислот с силикатными сорбентами в присутствии хаотропных солей и их последующей элюцией в низкосолевого буфера.

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;

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

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

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

0. В случае выпадения осадка прогреть *Сорбирующий раствор* при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.

I. В каждую пробирку объемом 1,5 – 2 мл внести по 500 мкл *Сорбирующего 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), внести 100 мкл *Элюирующего раствора*; в пробирку положительного контроля экстракции (ПКЭ) внести 100 мкл положительного контрольного образца (ПКО).

III. Пробу перемешать на вортексе и инкубировать в течение 10 мин при температуре 65 °С при постоянном (рекомендуется) или периодическом перемешивании.

IV. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 5 мин.

IV. Супернатант внести в Mini Spin колонку. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. В случае, если вся жидкость не прошла через колонку – повторить процедуру центрифугирования. Фильтрат удалить.

V. В колонку внести 500 мкл *Сорбирующего раствора*. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. Фильтрат удалить.

VI. В колонку внести 650 мкл *Промывочного раствора*. Центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 30 сек. Фильтрат удалить.

VII. Повторить п. VI.

VIII. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 3 мин.

IX. Колонку перенести в чистую пробирку объемом 1,5 – 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно нанести 15 – 100 мкл *Элюирующего раствора* (увеличение объема *Элюирующего раствора* приводит к повышению суммарного выхода РНК/ДНК, но к снижению ее концентрации в конечном образце). Для наибольшего выхода РНК/ДНК рекомендуется предварительно подогреть *Элюирующий раствор* до температуры 60 – 65 °С. Инкубировать 1 – 3 мин.

X. Центрифугировать при максимальных скоростях (но не более 16 000 об/мин) в течение 1 мин. Удалить колонку.

XI. Фильтрат содержит очищенные РНК и ДНК.

Допускается хранение полученного образца РНК/ДНК при температуре не выше 4 °С в течение суток, при температуре не выше -16 °С в течение 3 месяцев, при температуре не выше -68 °С в течение 1 года.

ТРАНСПОРТИРОВКА И ХРАНЕНИЕ

Транспортировка реагентов «АртРНК MiniSpin» осуществляется при температуре окружающей среды (но не более 30 °С) в течение всего срока годности. Реагенты «АртРНК MiniSpin» транспортируют любым видом транспорта в условиях, обеспечивающих их сохранность, в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на данном виде транспорта.

Реагенты «АртРНК MiniSpin» хранят в упаковке изготовителя при комнатной температуре (+15 – +25 °С) в течение всего срока годности.

Срок годности реагентов «АртРНК MiniSpin» – 12 месяцев с даты изготовления.