

**Набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых
кислот из растительного материала на роботизированных
станциях TECAN**

«ФитоСорб-Автомат-48»

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1.1 Полное название

Набор реагентов для автоматического выделения нуклеиновых кислот из растительного материала на роботизированных станциях TECAN, «ФитоСорб-Автомат-48»

1.2 Назначение

Набор реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот (НК) фитопатогенов из растительного материала – вирусов, вирионов, бактерий и др. Для гомогенизации (предварительного измельчения образца перед выделением НК) подходят все части растения – лист, корень, стебель и т.д..

1.3 Область применения

Область применения набора – лабораторная диагностика фитопатогенов, научные исследования. Набор может быть использован в лабораторных центрах и институтах, проводящих контроль фитосанитарного состояния растений, в том числе посадочного материала, в целях обнаружения РНК/ДНК фитопатогенов.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

Набор состоит из 7 компонентов.

№	Реагент	Описание	Объем, мл	Количество, шт
1	Экстрагирующий буфер	прозрачная бесцветная жидкость	250	1
2	Лизирующий раствор	прозрачная бесцветная жидкость	30	1
3	Сорбирующий раствор	суспензия магнитных частиц	5	1
4	Осаждающий раствор	прозрачная бесцветная жидкость	30	1
5	Промывочный раствор 1	прозрачная бесцветная жидкость	60	1
6	Элюирующий буфер	прозрачная бесцветная жидкость	12	1

2.2 Количество анализируемых проб

Набор рассчитан на 48 выделения, включая контрольные образцы.

2.3 Ограничения метода

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или

привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося в реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

3.1 Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, прошедшего подготовку на лицензированных курсах первичной специализации по работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности, получившего дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

3.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора

Все компоненты набора реагентов в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

3.3 Необходимые меры предосторожности в отношении влияния физических факторов

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности в отношении влияния магнитных полей, внешних электрических воздействий, электростатических разрядов, давления или перепадов давления, перегрузки, источников термического воспламенения.

3.4 Необходимые меры предосторожности против специальных рисков

При использовании набора реагентов нет необходимости принимать меры предосторожности против любых специальных рисков при использовании или реализации, поскольку в состав изделия не входят вещества человеческого или животного происхождения с учетом их потенциальной инфекционной природы.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Указания о необходимости использования специального оборудования

Набор реагентов может быть использован на роботизированных раскапывающих станциях Tecan Freedom EVO 150/8, 150/4 и 75/2 или их аналогах с объемом реакционного блока выделения не менее 1 мл. Автоматизированные станции для выделения ДНК должны быть установлены в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2 Дозирующие устройства

дозаторы переменного объема на 100-1000 мкл и наконечники к ним;
штатив для данных дозаторов;

4.3 Другое используемое оборудование

Ручная гомогенизация без применения жидкого азота:

стерильные ступки и пестики для гомогенизации растительного материала;
весы с точностью от 0,01 г;
микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901», Синтол);
штативы для микропробирок на 1,5 мл, например, «РМ-96х1,5/2,0» (Синтол);
холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов);
центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл до 13 000 об/мин, например, Eppendorf MiniSpin, Eppendorf 5424.

Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

стерильные ступки и пестики для гомогенизации растительного материала;
весы с точностью от 0,01 г;
сосуд Дьюара;
термос (для временного хранения жидкого азота);
штативы для микропробирок на 1,5 мл, например, «РМ-96х1,5/2,0» (Синтол).;
холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов);
центрифуга для микропробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5 мл до 13 000 об/мин, например, Eppendorf MiniSpin, Eppendorf 5424;
микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901», Синтол);

4.4 Лабораторная посуда

Комплект средств для обработки рабочего места.

4.5 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора реагентов

4.5.1 Для подготовки образцов к выделению ДНК

Стерильные одноразовые пинцеты;
микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;
одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочего места.

4.5.2 Для выделения ДНК на автоматизированных станциях

Одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,7 мл с крышками;
одноразовые пробирки типа «Эппендорф» на 1,7 мл без крышек;
одноразовые кондуктивные наконечники с аэрозольным барьером на 1000 мкл;
одноразовые кондуктивные наконечники с аэрозольным барьером на 200 мкл;
одноразовые глубокодонные 96-луночные планшеты;
мешки для автоклавирования для сброса отработанных наконечников
автоматизированной станции;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;
комплект средств для обработки рабочего места и автоматизированной станции.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

Отбор образцов осуществляется согласно МСФМ 31 Методики отбора образцов от грузов (2009 г.).

При использовании набора в качестве исследуемого материала может быть любой растительный материал, предназначенный для анализа фитопатогенов.

5.1 Приготовление пробирок с анализируемыми образцами

5.1.1 Рекомендованные количества образца^{1,2}

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг
	ручная гомогенизация
Растение	600-750
Бактериальная инфекция	
Грибная инфекция	
Вирусная/виroidная инфекция	150-300

¹ – в случае выделения из сухих частей растения, количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза.

² – при одновременном исследовании нескольких целевых объектов (например, бактериальная инфекция и вирусная инфекция), следует брать навеску 600-750 мг.

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

Транспортировку и хранение образцов для анализа проводят в соответствии с утвержденными протоколами ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов.

5.2 Предварительная подготовка биологического материала

5.2.1 Ручная гомогенизация без применения жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1-2 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**).
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**) в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть образцы.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

5.2.2 Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в ступку с образцом жидкий азот до уровня 1 см от дна ступки. Инкубировать 10 секунд.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
4. Убедиться, что ступка комнатной температуры, в случае если ступка холодная, перед добавлением экстрагирующего буфера подождать 2 минуты.
5. Добавить 4 мл **экстрагирующего буфера (реагент №1)** в ступку с исследуемым образцом и повторно растереть образцы до гомогенного состояния.
6. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.
7. Центрифугировать 4000 об/мин 5 минут.

Примечание: Во избежании контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед выделением следует убедиться в отсутствии осадка в реагенте №2. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 30-60 °С до полного растворения осадка.

6.1. Лизис

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать новые 1,7 мл пробирки.
2. Добавить 500 мкл **лизирующего раствора (реагент №2)** в каждую пробирку для исследуемого образца.
3. Отобрать 700 мкл супернатанта после центрифугирования образцов и перенести в подготовленные 1,7 мл пробирки, содержащие лизирующий раствор.

Примечание: в случае, если объем супернатанта меньше, чем 700 мкл, объем образца может быть уменьшен до 300-500 мкл.

4. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 65°C 10 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата и охладить пробирки при комнатной температуре. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин 5 минут.

При выделении ДНК на автоматизированной станции образцы после центрифугирования сразу помещаются в рабочий штатив станции, так как удаление супернатанта с лизирующим реагентом происходит автоматически на первом этапе программы.

5.2 Выделение ДНК на автоматизированных станциях

Выделение ДНК проводят согласно инструкции по эксплуатации роботизированной станции Tecan **Freedom EVO** к выделению ДНК. Для контроля

кросс-контаминации внутри станции в каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательные контроли выделения (**ОКО-В**) в количестве не менее 9 пробирок на 39 пробирок с исследуемыми образцами (для модели Tecan Freedom Evo 150) и 6 - на 18 (для модели Tecan Freedom Evo 75).

Приготовление пробирок с отрицательным контролем выделения проводят в чистом ШББ 2 класса. Возможно как ручное приготовление ОКО-В, так и приготовление в роботизированной станции.

Приготовление пробирок с отрицательным контролем выделения

- Дозатором переменного объема (100 - 1000 мкл) переносят в чистые маркированные пробирки с крышкой объемом 1,7 мл типа «Эппендорф» по 700 мкл **Экстрагирующего буфера** и 500 мкл **Лизирующего раствора (ОКО-В)**.

Для выделения ДНК набором реагентов «**ФитоСорб-Автомат-48**» с помощью роботизированной раскапывающей станции Tecan Freedom Evo

- Включают управляющий компьютер и саму станцию.
- В ШББ 2 класса на штативе «рабочее место» расставляют пробирки с образцами, перемежая их пробирками с ОКО-В. Пробирки с ОКО-В не должны располагаться рядом друг с другом ни в одном ряду, ни в соседних рядах. Номера пробирок ОКО-В для модели Tecan Freedom Evo 150: 2, 6, 12, 18, 22, 28, 34, 38, 44; номера пробирок ОКО-В для модели Tecan Freedom Evo 75: 2, 7, 9, 16, 18, 23.
- Центрифугируют пробирки с исследуемыми образцами и ОКО-В 5 минут при 12-14 тыс. об/мин на микроцентрифуге при комнатной температуре.
- **Осаждающий раствор** тщательно перемешивают вручную или на вортексе до полного ресуспендирования.
- Реагенты комплекта - **осаждающий раствор, промывочный раствор 1, элюирующий раствор и сорбирующий раствор** - переносят в предназначенные для них емкости объемом 100 мл и загружают в станцию.
- Загружают пустые открытые пробирки типа «Эппендорф» для ДНК объемом 1,7 мл, пустые пробирки типа «Эппендорф» без крышек объемом 1,7 мл, кондуктивные наконечники на 200 и 1000 мкл в соответствующие штативы на рабочем столе станции.
- Исследуемые образцы и ОКО-В помещают в соответствующие штативы и открывают, затем загружают в станцию.
- Запускают протокол Mgmto_EVO150, для модели Tecan Freedom Evo 150, или Mgmto_EVO75, для модели Tecan Freedom Evo 75. Далее следуют инструкциям протокола.

6 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

6.1 Условия хранения

Реактивы из набора реагентов «**ФитоСорб-Автомат-48**» следует хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре от плюс 18°C до плюс 25°C.

6.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С.

6.3 Срок годности

Срок годности набора реагентов составляет 12 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем.

Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

6.4 Информация по безопасной утилизации

Использованные пробирки с ампликонами, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ПЦР-боксе, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в рабочую зону 4-1 (либо специально предназначенное вспомогательное помещение) с целью последующей инактивации (МУ 1.3.2569-09).

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу А, как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТБО (СанПиН 2.1.7.2790-10).

6.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора реагентов требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (12 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «ФитоСорб-Автомат-48» направлять на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» (125499, Москва, Кронштадтский бульвар, д. 39, к.1., пом 1 ком. 43/РМ 12-3, тел. (495)984-69-93, факс. (499)977-74-55, E. mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «НПФ Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.