

**Набор реагентов для выделения ДНК из костного порошка
(на магнитных частицах) «М-Сорб-Кость»**

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ



СОДЕРЖАНИЕ

1.	НАЗНАЧЕНИЕ	3
1.1.	Назначение набора	3
1.2.	Описание модели «М-Сорб-Кость AutoMate Express»	3
1.3.	Область применения	3
1.4.	Потенциальные пользователи	3
1.5.	Принцип метода, положенный в основу работы набора	3
2.	ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА	4
2.1.	Состав набора	4
2.2.	Функциональные характеристики	4
3.	УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА	4
4.	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	4
5.	ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА	5
6.	ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	6
6.1.	Подготовка образца кости	6
6.2.	Подготовка образца зуба	6
6.3.	Подготовка образца волос	6
6.4.	Подготовка образца жевательной резинки	6
6.5.	Подготовка образца сигаретного окурка.....	6
6.6.	Подготовка образца клейкой ленты.....	7
7.	ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК	7
8.	ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	9
9.	ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	9
10.	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА	9

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Назначение набора

Набор реагентов «М-Сорб-Кость» предназначен для выделения геномной ДНК на магнитном сорбенте из порошка, полученного из образца кости или зуба. Набор может также применяться для выделения геномной ДНК из волос и носителей следов биологического происхождения: сигаретного окурка, жевательной резинки, клейкой ленты.

1.2. Описание модели «М-Сорб-Кость AutoMate Express»

Модель набора «М-Сорб-Кость AutoMate Express» (кат. № HG-503-AE) предназначена для выделения ДНК с использованием автоматической станции «AutoMate Express» (Applied Biosystems) и рассчитана на проведение 52 экстракций ДНК.

1.3. Область применения

Набор может быть использован в молекулярно-генетических лабораториях, занимающихся выделением и дальнейшим анализом геномной ДНК (в том числе в лабораториях, проводящих судебно-медицинскую экспертизу), а также в научно-исследовательских лабораториях и учреждениях.

1.4. Потенциальные пользователи

К работе с набором допускаются специалисты с высшим или средним медицинским, биологическим или ветеринарным образованием, получившие дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

1.5. Принцип метода, положенный в основу работы набора

Принцип метода, положенный в основу работы изделия, – лизирование объекта исследования в среде деминерализационного буфера; связывание нуклеиновой кислоты с ДНК-связывающим агентом, покрывающим магнитные частицы; отмывка магнитных частиц и элюирование выделенного продукта в элюирующий раствор.

В основе магнитных частиц – оксид железа, на поверхность которого нанесено кремнеземное покрытие. Нуклеиновые кислоты связываются с кремнеземным покрытием в присутствии хлорида калия. Он нарушает целостность молекулы ДНК, что приводит к потере гидрофобности и связыванию нуклеиновых кислот. Магнитные частицы с нуклеиновыми кислотами на поверхности отделяются от клеточного лизата путем создания магнитного поля внешним магнитом. После промывки и инкубации при 70 °С нуклеиновые кислоты отделяются от магнитных частиц, переходят в элюирующий раствор, и могут быть использованы в дальнейших исследованиях.

2. ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

2.1. Состав набора

Таблица 1 – Состав модели «М-Сорб-Кость AutoMate Express»

№	Компонент	Номинальный объем, мл/ масса, мг	Количество
1.	Декальцинирующий раствор	16 мл	1 флакон
2.	Лизирующий компонент	0,8 мл	1 пробирка
3.	Протеиназа К	5 мг	2 пробирки
4.	Буфер для растворения Протеиназы К	1,1 мл	1 пробирка
5.	Картридж с реагентами «М-Сорб-Кость AutoMate Express»: Осаждающий компонент Сорбирующий раствор Осаждающий раствор АЕ Промывочный раствор Элюирующий раствор	- 0,4 мл 0,04 мл 0,5 мл 0,5 мл 0,15 мл	52 шт. первая лунка вторая лунка третья лунка лунки с 4-й по 6-ую седьмая лунка
6.	Наконечники для «AutoMate Express»	-	52 шт.
7.	Колонки	-	52 шт.
8.	Пробирки для колонок	-	52 шт.
9.	Пробирки для сбора элюата	-	52 шт.

2.2. Функциональные характеристики

Эффективность выделения ДНК человека 2,5 и 25 нг/образец составляет не менее 30 %. Набор обеспечивает чистоту выделения ДНК менее 0,002 нг/мкл ДНК человека.

3. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ, СРОК ГОДНОСТИ НАБОРА

Хранение: в сухом месте, при температуре от 2 °С до 25 °С. Протеиназу К до разведения беречь от влаги.

ВАЖНО! Разведенную Протеиназу К хранить при температуре от минус 24 °С до минус 16 °С.

ВАЖНО! Картриджи с реагентами «М-Сорб-Кость AutoMate Express» не замораживать.

Транспортирование: крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным, воздушным) при температуре от 2 °С до 25 °С.

Эксплуатация: Исследование образцов с использованием набора должно проводиться при температуре от 15 °С до 35 °С и относительной влажности воздуха от 15 % до 75 %. Набор должен применяться в соответствии с действующей версией инструкции по применению. Набор предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. п. 1.2). Набор реагентов готов к применению согласно инструкции.

Срок годности набора: 14 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения. Срок годности реагентов до и после вскрытия соответствует сроку годности набора.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работа с набором должна проводиться в лаборатории, использующей методы амплификации нуклеиновых кислот для исследования материала, с соблюдением требований МУ 1.3.2569-09, СанПиН 3.3686-21, СанПиН 2.1.3684-21.

К работе с набором допускается только квалифицированный персонал, обученный

методам молекулярной диагностики и правилам работы в лаборатории в соответствии с СанПиН 3.3686-21. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению исследования материала методом ПЦР с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Применять набор реагентов строго по назначению;
- Рассматривать исходные исследуемые образцы биологического материала как потенциально инфекционно-опасные;
- Удалять и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии с СанПиН 3.3686-21;
- Соблюдать правила последовательной обработки материала и поточность продвижения исследуемого материала. Лабораторный процесс должен быть односторонним. Каждый этап анализа должен проводиться в самостоятельных рабочих зонах (помещениях). Запрещается перемещение лабораторного оборудования, в том числе дозаторов, штативов, лабораторной посуды, халатов, головных уборов и пр., а также растворов реагентов из одного помещения в другое;
- Использовать отдельный для каждого образца/реагента одноразовый наконечник с фильтром;
- Не использовать набор, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию в паспорте качества;
- Не использовать набор, если не соблюдались условия транспортирования и хранения согласно инструкции;
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами;
- Избегать контакта реагентов с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой, при необходимости обратиться за медицинской помощью. Тщательно вымыть руки по окончании работы.

Специфические воздействия набора реагентов на организм человека: канцерогенный эффект, мутагенное действие, репродуктивная токсичность отсутствуют.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности изделие является безопасным.

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. При соблюдении условий транспортировки, эксплуатации и хранения риски взрыва и возгорания отсутствуют.

5. ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ НАБОРА

- ПЦР-бокс или бокс микробиологической безопасности (БМБ) I или II класса;
- автоматическая станция выделения ДНК «AutoMate Express» (Applied Biosystems, США);
- термоблок для пробирок объемом 1,5-2,0 мл, до 1100 об/мин, с возможностью нагрева не менее чем до 70 °С;
- высокоскоростная центрифуга для пробирок объемом 1,5-2,0 мл до 10 - 15 тыс. об/мин;
- микроцентрифуга-вортекс;
- штатив для пробирок объемом 1,5 или 2,0 мл;
- набор дозаторов пипеточных переменного объема на 1000, 200, 20 мкл;
- холодильник от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой не выше минус 16 °С;
- наконечники с аэрозольным барьером для дозатора переменного объема на 1000, 200, 20 мкл;
- емкость для сброса использованных материалов.

6. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Подготовку образцов проводить в боксе биологической безопасности I или II класса.

6.1. Подготовка образца кости

Исследуемые образцы костной ткани очистить от внешних наслоений и фрагментов мягких тканей.

Очищенные фрагменты костной ткани необходимо тщательно промыть бидистиллированной водой. Рекомендуется провести деконтаминацию поверхности костных фрагментов ультрафиолетовым излучением (длина волны 254 нм, доза 1,0-1,5 Дж/см²) в течение 30 мин с каждой стороны. Тщательно высушить полученный костный фрагмент при комнатной температуре и гомогенизировать до состояния костного порошка.

Примечание – Рекомендуется выбирать способ гомогенизации костных фрагментов, не приводящий к нагреву исследуемого материала выше 50 °С.

Для последующего выделения ДНК использовать навеску костного порошка от 50 до 100 мг.

Примечание – Выделение ДНК из мягких тканей, удаленных с поверхности костных фрагментов, может быть проведено с использованием набора «М-Сорб» (кат. № HG-501, ООО «НПФ Синтол»).

6.2. Подготовка образца зуба

Исследуемые образцы зубов очистить от внешних наслоений и тщательно промыть бидистиллированной водой. Рекомендуется провести деконтаминацию поверхности зубов ультрафиолетовым излучением (длина волны 254 нм, доза 1,0-1,5 Дж/см²) в течение 30 мин с каждой стороны. Тщательно высушить при комнатной температуре.

Наибольшее количество ДНК может быть получено из содержимого зубного канала. По возможности рекомендуется вскрыть зубные каналы и использовать для выделения ДНК фрагменты пульпы. В случае, если пульпа не может быть отделена от стенок зубных каналов, необходимо измельчить зуб до мелких фрагментов размером не более 1 мм. Для последующего выделения ДНК использовать навеску измельченных фрагментов зуба от 50 до 100 мг.

Примечание – Для экстракции ДНК рекомендуется отобрать измельченные фрагменты, содержащие стенки зубного канала с пульпой.

6.3. Подготовка образца волос

Исследуемые образцы волос промыть бидистиллированной водой и высушить. Отрезать фрагмент стержня волоса с волосяной луковицей длиной 3-5 мм. Выделение ДНК может быть также проведено из образцов волос, не подвергнутых предварительной промывке. Такой подход может повысить суммарный выход экстрагированной ДНК. Однако, необходимо иметь в виду, что наложения, присутствующие на стержне волоса могут являться источником контаминации.

6.4. Подготовка образца жевательной резинки

Растянуть жевательную резинку в виде тонкого кружка на чистой чашке Петри. Закрывать чашку и заморозить ее при минус 80 °С в течение как минимум 2-х часов. Достать чашку Петри, разрезать жевательную резинку на 8 частей. Использовать только один кусочек для выделения ДНК.

6.5. Подготовка образца сигаретного окурка

Необходимо использовать только оберточную бумагу, покрывающую сигаретный фильтр. Отрезать кусочек размером 5 мм и разрезать его на 2-3 более мелких кусочка, которые будут использованы для выделения ДНК. Необходимо минимизировать количество волокон сигаретного фильтра, попадающего в образец.

6.6. Подготовка образца клейкой ленты

Отрезать кусочек размером до 2 см² и разрезать его на 5-6 более мелких кусочков, которые будут использованы для выделения ДНК.

7. ПРОТОКОЛ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК

Работы с подготовкой реагентов и образцов для постановки в автоматическую станцию проводить в боксе биологической безопасности I или II класса, либо ПЦР-боксе.

1. Если набор хранился в холодильнике, перед началом работы все компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18-25°C) в течение 30 мин.
2. При первом использовании добавить в пробирку с сухой *Протеиназой К* 550 мкл *Буфера для растворения Протеиназы К*.
3. Закрыть пробирку крышкой, перемешать на вортексе до растворения *Протеиназы К*, центрифугировать для сброса капель.
4. Нагреть термошейкер до 56 °C.
5. Вставить необходимое количество колонок в пробирки для колонок и промаркировать.
 - **При исследовании образца кости или зуба** поместить в промаркированную колонку, вставленную в пробирку для колонок, по 50-100 мг костного порошка или измельченных фрагментов зуба. Кратковременно центрифугировать пробирки для сброса костного порошка на дно.
 - **При исследовании образца волос** поместить в промаркированную колонку, вставленную в пробирку для колонок, фрагмент (от 1 до 10) стержня волоса с волосяной луковицей длиной 3-5 мм. Кратковременно центрифугировать пробирки для сброса фрагмента стержня волоса на дно.
 - **При исследовании образца жевательной резинки, сигаретного окурка, клейкой ленты** поместить в промаркированную колонку, вставленную в пробирку для колонок, подготовленные кусочки образца. Кратковременно центрифугировать пробирки для сброса кусочков образца на дно.
6. Приготовить рабочий раствор для исследуемого количества образцов. Для этого смешать из расчета на один образец: 300 мкл *Декальцинирующего раствора*, 15 мкл *Лизирующего компонента* и 20 мкл *Протеиназы К*.
7. Добавить в колонку с образцом 335 мкл рабочего раствора.
8. Закрыть колонку крышкой.
9. Поместить пробирку с колонкой в термошейкер и инкубировать при 56 °C и 1100 об/мин в течение 2-4 ч для образцов кости/зуба или в течение 1 ч для образцов волос, жевательной резинки, сигаретного окурка, клейкой ленты.
10. После проведения лизиса центрифугировать пробирки с вставленными колонками 2 мин при 10000-15000 об/мин для переноса лизата из колонок в пробирки для колонок.

Примечание – Если объем собранного лизата составляет менее 150 мкл, дополнительно центрифугировать пробирки с колонками в течение 5 мин при 10000-15000 об/мин.
11. Аккуратно вынуть и удалить колонки из пробирок для колонок.

12. Для запуска автоматической станции «AutoMate Express» обратиться к инструкции ее производителя.
13. Извлечь из упаковки необходимое количество картриджей (по числу образцов, один картридж рассчитан на выделение 1 образца) с реагентами «М-Сорб-Кость AutoMate Express», установить картриджи в держатель.
14. Поместить держатель с картриджами в автоматическую станцию «AutoMate Express» (см. рисунок 1).



Рисунок 1 - Установка держателя с помещенными в него картриджами с реагентами «М-Сорб-Кость AutoMate Express» в автоматическую станцию

15. Установить в штатив пробирки для колонок с образцами, полученными после лизиса согласно п. 11, а также пробирки для сбора элюата и наконечники согласно количеству образцов.
16. Поместить штатив в автоматическую станцию «AutoMate Express» (см. рисунок 2).



Рисунок 2 - Установка штатива с пробирками и наконечниками в автоматическую станцию

17. Выбрать протокол выделения **PF Express BTA** на автоматической станции «AutoMate Express» и запустить выделение.
18. После завершения выделения извлечь пробирки для сбора элюата с выделенными препаратами ДНК, отработанные картриджи с реагентами и наконечники извлечь и утилизировать.

Примечание – Полученный раствор ДНК может храниться при температуре от 2 °С до 8 °С в течение суток и при температуре не выше минус 16 °С в течение года.

8. ИНФОРМАЦИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

Компоненты набора реагентов (использованные, неиспользованные, пришедшие в негодность в связи с истечением срока годности и/или несоблюдением регламентированного режима хранения, транспортирования и применения), внешнюю упаковку набора, эксплуатационную документацию необходимо утилизировать в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.3684-21.

9. ГАРАНТИИ ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Производитель гарантирует соответствие характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение указанного срока годности при соблюдении условий его транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора направлять производителю ООО «НПФ Синтол» по адресу: 127550, г. Москва, Тимирязевская ул., д. 42, тел. (495) 984-69-93, e-mail: syntol@syntol.ru.

10. СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Значение
	Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Температурный диапазон
	Беречь от влаги
	Содержимого достаточно для проведения n тестов
	Изготовитель
	Дата изготовления
	Использовать до
	Номер по каталогу
	Код партии
	Запрет на повторное применение
	Верх