

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора Федерального бюджетного
учреждения науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека

В.В. Малеев

« 30 » ноября 2015 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для экстракции ДНК из биологического материала
«АмплиСенс[®] ДНК-сорб-Д»

АмплиСенс[®]



ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора,
Российская Федерация, 111123,
город Москва, улица Новогиреевская, дом 3а

IVD

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
НАЗНАЧЕНИЕ	3
ПРИНЦИП МЕТОДА	3
ФОРМЫ ВЫПУСКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ	4
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	4
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ.....	6
ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА	7
ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК	8
СОСТАВ.....	9
ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ.....	10
СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ.....	13
ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ	15
СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ.....	16

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции применяются следующие сокращения и обозначения:

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ОК	– отрицательный контроль экстракции
ОКО	– отрицательный контрольный образец
ПК	– положительный контроль экстракции
ПКО	– положительный контрольный образец
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов **«АмплиСенс® ДНК-сорб-Д»** предназначен для экстракции ДНК из эпителиальных клеток (цервикальных соскобов), взятых в транспортно-фиксирующую спиртосодержащую среду для жидкостной цитологии (например, PreservCyt (Hologic Inc («Холоджик Инк.»), США) или другие рекомендованные производителем) для последующего исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Экстракция ДНК является преаналитической процедурой метода ПЦР.

Объем исследуемого образца для предобработки: 2-5 мл.

Объем исследуемого (предобработанного) образца для экстракции: 100 мкл.

ВНИМАНИЕ! Информацию об интерферирующих веществах и ограничениях, связанных с пробой, смотрите в инструкции к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Исследуемые образцы обрабатываются муколизином для растворения слизи цервикального канала. Далее производится отмывка клеток от транспортной среды с помощью фосфатного буферного раствора (PBS-буфера), деструкция клеточных мембран путем их лизиса детергентом (цитолизином), в результате чего происходит высвобождение ДНК и деградации белков протеазой. Освобожденная от белков ДНК очищается сорбцией на силикагеле. Растворенная ДНК связывается с частицами сорбента, в то время как другие компоненты

лизированного биологического материала остаются в растворе и удаляются при осаждении сорбента центрифугированием и последующей отмывкой. При последовательном добавлении буфера для элюции к сорбенту происходит переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется от частичек сорбента центрифугированием.

В результате указанной процедуры получается высокоочищенный препарат ДНК, свободный от ингибиторов реакции амплификации, что обеспечивает высокую аналитическую чувствительность ПЦР-исследования.

ФОРМЫ ВЫПУСКА КОМПЛЕКТА РЕАГЕНТОВ

Комплект реагентов выпускается в 1 форме комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «АмплиСенс[®] ДНК-сорб-Д» вариант 100.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования биологического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней, с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

При работе необходимо всегда выполнять следующие требования:

- Рассматривать исследуемые образцы как инфекционно-опасные, организовывать работу и хранение в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
- Убирать и дезинфицировать разлитые образцы, используя дезинфицирующие средства в соответствии СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп

патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

- Лабораторный процесс должен быть однонаправленным. Анализ проводится в отдельных помещениях (зонах). Работу следует начинать в Зоне Экстракции, продолжать в Зоне Амплификации и Детекции. Не возвращать образцы, оборудование и реагенты в зону, в которой была проведена предыдущая стадия процесса.
- Неиспользованные реагенты, реагенты с истекшим сроком годности, а также использованные реагенты, биологический материал, включая материалы, инструменты и предметы, загрязненные биологическим материалом, следует удалять в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами»
- Использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических дозаторов с фильтром¹. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
- Комплект реагентов предназначен для одноразового применения для проведения исследования указанного количества проб (см. раздел «Состав»).
- Комплект реагентов готов к применению согласно данной инструкции. Применять комплект реагентов строго по назначению.
- К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клиничко-диагностической лаборатории в установленном порядке (СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»).
- Не использовать комплект реагентов, если нарушена внутренняя упаковка или внешний вид реагента не соответствует описанию.
- Не использовать комплект реагентов, если не соблюдались

¹ Для удаления надосадочной жидкости в процессе экстракции используются одноразовые наконечники без фильтра.

условия транспортирования и хранения согласно инструкции.

- Не использовать комплект реагентов по истечении срока годности.
- Использовать одноразовые неопудренные перчатки, лабораторные халаты, защищать глаза во время работы с образцами и реагентами. Тщательно вымыть руки по окончании работы. Все операции проводятся только в перчатках для исключения контакта с организмом человека.
- Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте немедленно промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.
- Листы безопасности реагентов (SDS – safety data sheet) доступны по запросу.

Оценка вероятных событий, в результате наступления которых могут произойти отрицательные последствия для организма человека:

При использовании по назначению и соблюдении вышеперечисленных мер предосторожности контакт с организмом человека исключен. При аварийных ситуациях возможно следующее:

- раздражение слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц,
- раздражение кожи у чувствительных лиц,
- аллергическая реакция,
- вред при вдыхании,
- вред при приеме внутрь.

Специфические воздействия комплекта реагентов на организм человека:

- Канцерогенный эффект отсутствует.
- Мутагенное действие отсутствует.
- Репродуктивная токсичность отсутствует.
- Аллергическая реакция отсутствует.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся пробирки объемом 5,0 и 1,5 мл (например, Ахуген, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).

2. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с фильтром до 200 мкл и до 1000 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
3. Одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема до 200 мкл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
4. Штативы для пробирок объемом 1,5 мл и 5 мл (например, Axugen, Inc. («Эксиджен, Инк»), США, или аналогичные).
5. Ламинарный бокс класс биологической безопасности II тип А (например, «БВВп-01-«Ламинар-С»-1,2», ЗАО «Ламинарные системы», Россия, или аналогичные).
6. Микроцентрифуга для пробирок типа «Эппендорф» с максимальной скоростью центрифугирования не менее 12 тыс g (например, MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»), Германия, или аналогичная).
7. Вортекс (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
8. Термостат для пробирок типа «Эппендорф» от 25 до 100 °С (например, SIA Biosan, Латвия, или аналогичный).
9. Вакуумный отсасыватель медицинский с колбой-ловушкой для удаления надосадочной жидкости (например, «ОМ-1», ООО «Утес», Россия, или аналогичный).
10. Автоматические дозаторы переменного объема (например, ООО «Биохит», Россия, или аналогичные).
11. Холодильник от 2 до 8 °С с морозильной камерой от минус 24 до минус 16 °С.
12. Отдельный халат, шапочки, обувь и одноразовые перчатки по МУ 1.3.2569-09.
13. Одноразовые пластиковые контейнеры для сброса и инактивации материалов.

ВЗЯТИЕ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА

Материалом для исследования служат образцы цервикальных соскобов, взятых в транспортно-фиксирующую спиртосодержащую среду для жидкостной цитологии (например, PreservCyt (Hologic Inc («Холоджик Инк.»), США). Допускается хранение образцов в транспортно-фиксирующей

среде для жидкостной цитологии при температуре от 18 до 25 °С в течение года.

Взятие, транспортирование и хранение биологического материала проводить в соответствии с методическими рекомендациями «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанными ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, и СП 1.3.2322-08.

ПОДГОТОВКА ИССЛЕДУЕМОГО МАТЕРИАЛА К ЭКСТРАКЦИИ ДНК

ВНИМАНИЕ! Следует помнить, что отбирать аликвоту клеток для исследования методом ПЦР нужно только одноразовыми наконечниками с фильтром и только в одноразовую пробирку. Важно, чтобы первой отбиралась аликвота клеток для ПЦР-исследования, второй – для проведения жидкостной цитологии.

Концентрирование эпителиальных клеток.

Способ первый.

1. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок на 5 мл, равное количеству исследуемых образцов, промаркировать. Каждую баночку с образцом для жидкостной цитологии интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток, затем аккуратно открыть и перенести **2-5 мл клеток** (в зависимости от плотности клеточной суспензии) в приготовленные пробирки.
2. Оставить пробирки в штативе при температуре от 18 до 25 °С на ночь для оседания клеток или центрифугировать на микроцентрифуге **10 мин** при **0,6 тыс г** (например, **3 тыс об/мин** для микроцентрифуги MiniSpin², Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)).
3. Не захватывая клеточный осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 1000 мкл, используя автоматический дозатор.
4. Оставшиеся примерно **1 мл** осадка с надосадочной жидкостью аккуратно перенести в чистую пробирку на 1,5

² Пересчет единиц измерения g в об/мин для микроцентрифуги MiniSpin (Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)) и способ пересчета единиц измерения для других моделей микроцентрифуг см. в методических рекомендациях по применению данного комплекта реагентов.

мл, используя отдельный наконечник с фильтром, промаркировать и центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** (например, **12 тыс об/мин** для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)) в течение **2 мин.**

5. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Оставить **100-200 мкл осадка** с надосадочной жидкостью.

Способ второй.

1. Баночки с образцами для жидкостной цитологии интенсивно встряхнуть для дезинтеграции клеток и оставить на ночь для оседания клеток.
2. Автоматическим дозатором на 1000 мкл отобрать **0,5 – 1,0 мл** клеток со дна баночки и перенести в чистую пробирку на 1,5 мл, промаркировать.
3. Центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** (например, **12 тыс об/мин** для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)) в течение **2 мин.**
4. Не захватывая осадок, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель. Оставить **100-200 мкл осадка** с надосадочной жидкостью.

СОСТАВ

Комплект реагентов «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» вариант 100
- комплект реагентов для экстракции ДНК из биологического материала – **включает:**

Реагент	Описание	Объем, мл	Количество
Цитолизин	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 флакона
МУКОЛИЗИН	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
PBS-буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Лизирующий раствор ³	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1 флакон
Отмывочный раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1 флакон
Сорбент универсальный	Суспензия белого цвета	1,0	3 пробирки
Буфер для элюции В	Прозрачная бесцветная жидкость	5,0	2 пробирки
ОКО	Прозрачная бесцветная жидкость	1,2	2 пробирки

Комплект реагентов вариант 100 рассчитан на экстракцию ДНК из 100 проб, включая контроли.

ЭКСТРАКЦИЯ ДНК ИЗ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Порядок работы

Отмывка клеток.

1. К осадку добавить **1 мл МУКОЛИЗИНА**, тщательно перемешать на вортексе и поставить в штатив на **30 мин.** Если в пробирке видны следы нерастворившейся слизистой пробки, перемешать пробирку на вортексе и поставить в штатив еще на **10 – 15 мин.**
2. Пробирки центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** в течение **2 мин.**
3. По внутренней стенке пробирки, не захватывая осадок, аккуратно удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробирки. Оставить **100-200 мкл** осадка.
4. К осадку добавить **1 мл PBS-буфера**, тщательно

³ При хранении лизирующего раствора при температуре от 2 до 8 °С возможно образование осадка в виде кристаллов.

- перемешать на вортексе.
5. Пробирки центрифугировать на микроцентрифуге при **10 тыс g** в течение **2 мин**.
 6. По внутренней стенке пробирки, не захватывая осадок, аккуратно удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник без фильтра на 200 мкл для каждой пробирки. Оставить **100-200 мкл** осадка. Затем, не захватывая осадок, аккуратно удалить остаток надосадочной жидкости из каждой пробирки отдельным наконечником с фильтром на 200 мкл, **используя автоматический дозатор**.
 7. Добавить в пробирки с клеточным осадком по **100 мкл цитолизина**, тщательно ресуспендировать осадок пипетированием, используя отдельный наконечник с фильтром на 200 мкл для каждой пробы. Плотнo закрыть пробирки и перемешать на вортексе.
 8. Пробирки инкубировать в течение **2 ч** или **ночи** при температуре **60 °С**.

Очистка ДНК на силикагеле.

1. **Лизирующий раствор** (если он хранился при температуре от 2 до 8 °С) прогреть при температуре 65 °С до полного растворения кристаллов.
2. Подготовить пробирки отрицательного и положительного контролей экстракции (если они предусмотрены для проведения ПЦР-исследования)⁴. Для этого в пробирку отрицательного контроля (ОК) экстракции внести в **100 мкл ОКО⁵**, в пробирку положительного (ПК) контроля экстракции внести **90 мкл ОКО⁵** и **10 мкл ПКО⁵**.
3. Добавить в каждую пробирку, в том числе в пробирки с контролями экстракции, по **300 мкл лизирующего раствора**.
4. Плотнo закрыть крышки, тщательно перемешать на вортексе и прогреть **5 мин** при температуре **65 °С**. Осадить капли на вортексе. Если проба растворилась не полностью,

⁴ Результаты постановки контролей этапа экстракции используются при оценке достоверности результатов ПЦР-исследования биологических образцов. Анализ и оценка результатов для контролей проводится согласно инструкции к набору реагентов для проведения амплификации.

⁵ Допускается изменение объема контрольных образцов, см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации.

- центрифугировать пробирку на микроцентрифуге в течение **5 мин** при **10 тыс g** и использовать для экстракции ДНК надосадочную жидкость, перенести ее в новую пробирку на 1,5 мл.
5. Ресуспендировать **сорбент универсальный**, интенсивно перемешивая на вортексе. Добавить в каждую пробирку отдельным наконечником по **25 мкл** ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на **2 мин**, еще раз перемешать и оставить в штативе на **5 мин**.
 6. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **30 сек** при **2 тыс g** (например, **5 тыс об/мин** для микроцентрифуги MiniSpin, Eppendorf Manufacturing Corporation («Эппендорф Мануфэктуринг Корпорэйшн»)).
 7. По внутренней стенке пробирки, не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 8. Добавить в пробирки по **1 мл отмывочного раствора**, плотно закрыть крышки, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального.
 9. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **30 с** при **2 тыс g**.
 10. По внутренней стенке пробирки, не захватывая сорбент, удалить надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником без фильтра на 200 мкл, используя вакуумный отсасыватель.
 11. Поместить пробирки с открытыми крышками в термостат с температурой **65 °C** на **5-10 мин** для подсушивания сорбента универсального.
 12. Добавить в пробирки по **100 мкл буфера для элюции В**, плотно закрыть крышки. Перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента. Поместить в термостат с температурой **65 °C** на **5 мин**, периодически встряхивая на вортексе. **Допускается увеличение объема элюции до 150 мкл (см. инструкцию к используемому набору реагентов для проведения амплификации).**
 13. Центрифугировать пробирки на микроцентрифуге в течение **1 мин** при **10 тыс g**. Надосадочная жидкость содержит

очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке ПЦР.

Очищенная ДНК может храниться при температуре от 2 до 8 °С в течение недели, при температуре от минус 24 до минус 16 °С в течение 6 мес и при температуре не выше минус 68 °С в течение года. Для этого необходимо, не захватывая осадок, перенести надосадочную жидкость в стерильную пробирку.

СРОК ГОДНОСТИ. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 12 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 8 °С не более 5 сут. При получении разукomплектовать в соответствии с указанными температурами хранения. Допускается транспортирование при температуре от 2 до 25 °С не более 3 сут.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 2 до 8 °С.

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

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

Рекламации на качество комплекта реагентов «**АмплиСенс® ДНК-сорб-Д**» направлять в отдел рекламаций, организации обучения и контроля качества по адресу 115035, г. Москва, ул. Садовническая, д. 20/13, стр. 2 (тел. (495) 664-28-84, факс (495) 664-28-89, e-mail: cs@ilslab.ru)⁶.

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению комплекта реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и медицинских работников при применении и эксплуатации комплекта реагентов, рекомендуется направить сообщение в отдел по работе с рекламациями по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулируемую организацию (в РФ – Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения) в соответствии с действующим законодательством.

Заведующий НПЛ ОМДиЭ
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора



Е.Н.Родионова

Главный врач ФГБУ «Поликлиника № 1»
Управления делами Президента Российской Федерации



Е.В.Ржевская

⁶ Отзывы и предложения о продукции «АмплиСенс» вы можете оставить, заполнив анкету потребителя на сайте: www.amplisens.ru.

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ПЕЧАТНОЙ ПРОДУКЦИИ

	Номер в каталоге		Максимальное число тестов
	Код партии		Использовать до
	Изделие для in vitro диагностики		Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Дата изменения		Не допускать попадания солнечного света
	Ограничение температуры		Дата изготовления
	Производитель		