

**Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот
из растительного материала ручным способом и на
автоматизированных станциях KingFisher Flex System
или/и их аналогах**

«Фитоскрин-Экспресс»

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Полное название

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала ручным способом и на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах «Фитоскрин-Экспресс».

1.2 Назначение

Набор реагентов «Фитоскрин-Экспресс» предназначен для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала. Набор может также использоваться для выделения нуклеиновых кислот (НК) фитопатогенов из растительного материала – вирусов, вириодов, 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 «Фитоскрин-Экспресс» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор реагентов «Фитоскрин-Экспресс»

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из растительного материала «Фитоскрин-Экспресс» рассчитан на **96** выделений при ручной гомогенизации.

№	Реагент	Описание	Объем, мл	Количество, шт
1	Экстрагирующий буфер, PBS	Прозрачная бесцветная жидкость	250	2
2	Лизирующий раствор, ЛОР	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1
3	Сорбирующий раствор, СР	Суспензия магнитных частиц	5	1
4	Промывочный раствор, ПР	Прозрачная бесцветная жидкость	100	1
5	Элюирующий буфер, ЭР	Прозрачная бесцветная жидкость	15	1
6	Деинизованная вода	Прозрачная бесцветная жидкость	1,7	2

2.2 Ограничения

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» 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, получившим 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 в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать стандартные 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 следует обратиться за медицинской помощью немедленно.

Компонент «Лизирующий раствор, ЛОР» классифицируется как опасный. Коды заявленной опасности: химическая продукция, вызывающая поражение/раздражение кожи – H302, H332, H315; химическая продукция, вызывающая повреждения/раздражение глаз – H319; химическая продукция, вызывающая коррозию металла H290.

Компонент набора «Экстрагирующий буфер (PBS)» содержит азид натрия.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

4.1 Указания о необходимости использования специального оборудования

Работу с набором (комплект для выделения НК) следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) не ниже 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия, ФСР 2012/13259), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

Комплект реагентов для выделения НК может быть использован в автоматизированных станциях KingFisher Flex System (ThermoFisher, США, ФСЗ 2009/05562) или их аналогах. Автоматизированные станции для выделения НК должны быть установлены в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

4.2 Дозирующие устройства

Набор автоматических пипеток переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл; штатив для данных пипеток.

4.3 Другое используемое оборудование

4.3.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК

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»); штативы для микропробирок на 1,5 мл; холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

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; холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»)

4.3.2 Для выделения ДНК/РНК ручным способом

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, «Циклотемп-303»);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5424);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1);

штативы для наконечников;

магнитный штатив для микропробирок объемом 1,5 и 2 мл (например, «М-24»,

Синтол

холодильник на 2-8 °С.

4.3.3. Для выделения ДНК на автоматизированных станциях

Холодильник на 2-8 °С.

4.4 Лабораторная посуда

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

4.5 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора

4.5.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК

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 НК

Микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые пипетки Пастера объемом 1-3,5 мл (при отсутствии отсасывателя медицинского);

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 1000 мкл;

одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 мкл;

отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ

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

Рекомендованные количества образца¹

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

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» 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.

5.1 Предварительная подготовка биологического материала

5.1.1 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, PBS.
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера, PBS 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.

5.1.2 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, PBS 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.

5.1.3 Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

1. Добавить в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки 500 мкл экстрагирующего буфера, PBS
2. В пробирки с экстрагирующим буфером добавить 200 мкл образца
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

5.2 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых проб

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

6.1 ПРОВЕДЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ НК ручным методом

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (ОКО-В) (1 на 10-24 исследуемых образцов при ручном выделении или 1 на 24-48 при автоматическом выделении), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ (ОТ-ПЦР-РВ) вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения РНК.

ВНИМАНИЕ! При возникновении «аварии» на каком-либо этапе во время выделения РНК (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы!

ВНИМАНИЕ! Все реактивы необходимо предварительно довести до комнатной температуры и перемешать плавным переворачиванием.

6.1.1 Лизис

1. После предварительной подготовки, во время центрифугирования подготовить и промаркировать новые 1,5 мл пробирки.
2. Добавить 300 мкл лизирующего раствора, ЛОР в каждую пробирку для исследуемого образца и ОКО-В.
3. Флакон с сорбирующим раствором, СР тщательно перемешивать и внести в пробирки по 50 мкл

Примечание: При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором, ЛОР добавить весь объем сорбирующего раствора, СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в подготовленные пробирки по 350 мкл рабочего раствора.

4. Отобрать 300 мкл супернатанта после центрифугирования образцов и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки, содержащие лизирующий и сорбирующий раствор. В пробирки для ОКО-В добавить 300 мкл деинизованной воды.

5. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 65°C 10 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждые 2 минуты.

6. Вынуть пробирки из термостата и остудить при комнатной температуре.

6.1.2 Сорбция и осаждение НК

1. Тщательно перемешать содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента и выдержать 7 минут при комнатной температуре, периодически перемешивая;
2. Установить пробирки в высокоскоростную центрифугу. Пробирки устанавливаются «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугировать в течение 3 мин. при 10 тыс. об·мин⁻¹;
3. Установить пробирки в магнитный штатив на 1-2 мин. Аккуратно удалить надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент;
Примечание: Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!
4. Вынуть пробирки из магнитов и переставить в обычные лунки.

6.1.3. Промывка НК

1. Добавить к сорбенту 500 мкл **промывочного раствора, ПР** и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата магнитных частиц.
Примечание: при слипании сорбента необходимо разрушить конгломерат магнитных частиц с помощью микроцентрифуги-встряхивателя, интенсивность перемешивания может быть увеличена, однако необходимо избегать механического повреждения пробирок.
2. Центрифугировать пробирки при 4000 об/мин 1 минуту.
3. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.
4. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент**.
5. Повторить пункты 1-4 этапа **Промывка НК** еще один раз.
Примечание: Надосадочную жидкость необходимо отбирать **ПОЛНОСТЬЮ** во избежание снижения эффективности выделения и ингибирования ПЦР!

6.1.4. Десорбция НК

1. Подготовить и промаркировать чистые 1,5 мл пробирки
2. Добавить 150 мкл **элюирующего раствора, ЭР** в пробирки с высушенным сорбентом.
3. Перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.
4. Инкубировать при 65°C 10 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.
5. Вынуть пробирки из термостата.
6. Центрифугировать при 13000 об/мин 1 минуты.
7. Установить пробирки в магнитный штатив на 1 минуту.
8. Перенести 130 мкл супернатанта в подготовленные чистые 1,5 мл пробирки в соответствии с маркировкой, **не задевая сорбент**.
Примечание: в случае забора сорбента рекомендуется повторить пункты 6-8 этапа **Элюция НК**. Наличие сорбента в чистом растворе ДНК/РНК уменьшает качество и срок хранения раствора, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.).

6.2. ПРОВЕДЕНИЕ ВЫДЕЛЕНИЯ НК на автоматизированных станциях KingFisher Flex System или их аналогах

Для выделения НК комплектом «Фитоскрин-Экспресс» с помощью роботизированной станции KingFisher Flex System:

6.2.1. Включить управляющий компьютер и саму станцию.

6.2.2. В чистой ёмкости смешать лизирующий раствор ЛОР и сорбирующий раствор СР. Из расчета 300 мкл ЛОР + 50 мкл СР.

Тщательно перемешать;

6.2.3. Внести в лунки **рабочего планшета 1** по 350 мкл готовой смеси ЛОР+СР;

Примечание: При использовании комплекта в полном объеме можно во флакон с лизирующим раствором, ЛОР добавить весь объем сорбирующего раствора, СР. Полученную смесь тщательно перемешать и внести в подготовленные пробирки по 350 мкл рабочего раствора.

6.2.4. Внести в лунки **планшета 2** по 500 мкл промывочного раствора, ПР;

6.2.5. Внести в лунки **планшета 3** по 500 мкл промывочного раствора, ПР;

6.2.6. Внести в лунки **планшета 4** по 150 мкл элюирующего раствора, ЭР;

6.2.7. Внести в лунки **подготовленного планшета 1** по 300 мкл образцов (включая ОКО-В)¹;

6.2.8. Запускают протокол и далее следуют инструкциям протокола.

6.3 Условия хранения выделенных образцов НК

Раствор ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

Раствор РНК может храниться при температуре не выше минус 18°C в течение 6 месяцев, и в течение года при температуре минус 78°C.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1 Условия хранения

Набор реагентов «Фитоскрин-Экспресс» хранить при температуре от плюс 4 до плюс 8 °С в сухом защищенном от света месте.

7.2 Условия транспортирования

¹ В каждую партию выделения наряду с исследуемыми образцами необходимо включать **ОКО-В** (1 на 24-48 образцов), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ/ОТ-ПЦР-РВ вместе с другими образцами. **При выделении полного рабочего планшета (96 образцов) в постановку рекомендуется включить 3 ОКО-В (позиции В2, Е6, G12).**

Транспортирование набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 4 до плюс 8 °С.

7.3 Срок годности

Срок годности 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.

7.4 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).

7.5 Гарантийные обязательства производителя

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (18 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Фитоскрин-Экспресс» направлять на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, 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 лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.