

RevoDx

Набір для виділення геномної ДНК із крові

RevoDx Genomic DNA Purification Kit from Blood

Інструкція з використання

Для очищення ДНК зі свіжої або замороженої крові людини, консервованої цитратом, гепарином або EDTA
Для діагностики *in vitro*.
Тільки для професійного використання

CE

IVD

Каталожні номери:
IP201909-50 – 50 тестів
IP201909-100 – 100 тестів

Склад набору

	Назва компоненту	50 тестів	100 тестів
1	Буфер для лізису (Lysis Buffer)	11 мл	22 мл
2	Буфер для промивання 1 (Wash Buffer 1)	14 мл	28 мл
3	Буфер для промивання 2 (Wash Buffer 2)	21 мл	42 мл
4	Буфер для елюції (Elution Buffer)	11 мл	22 мл
5	Протеїназа К (Proteinase K *)	1 пробірка	2 пробірки
6	Спін-колонки з пробірками для збору (Spin Columns with Collection Tubes)	50	100
7	Пробірки для збору 2 мл (2 ml Collection Tubes)	150	300
8	Пробірки для елюції 1,5 мл (1.5 ml Elution Tubes)	50	100
9	Інструкція з використання (Product Manual)	1	1

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати при температурі навколишнього середовища. Після отримання реагент Протеїназа К (Proteinase K) вийняти з упаковки та зберігати при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід щільно закрити та зберігати при кімнатній температурі (від 15 °C до 30 °C). За умови належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільні до закінчення терміну придатності, який зазначений на етикетці продукту.

Передбачене використання

Набір RevoDx DNA Purification Kit from Blood призначений для швидкого очищення ДНК зі свіжої або замороженої крові людини, консервованої цитратом, гепарином або EDTA. Очищена ДНК підходить для подальших діагностичних застосувань, таких як різні види ПЛР, клонування, RFLP аналіз і секвенування. Будь-які діагностичні результати, отримані у зв'язку з будь-яким подальшим діагностичним аналізом з використанням цього набору, слід інтерпретувати відповідно до всіх інших клінічних і лабораторних результатів.

Загальний опис

Екстракція нуклеїнових кислот відіграє важливу роль в молекулярній діагностиці як первинний етап для багатьох подальших досліджень. Очікується, що високоякісний екстракт нуклеїнової кислоти не містить інгібіторів ампліфікації та інших речовин, які можуть впливати на роботу ферментів. Набір RevoDx DNA Purification Kit from Blood передбачає використання спеціальних буферів для лізису в поєднанні з спін-колонками на основі діоксиду-кремнію для ефективного очищення ДНК з біологічних зразків. Зразки лізують в оптимізованих буферах, що містять хаотропні солі. Буфер для зв'язування забезпечує селективне зв'язування ДНК з кремнієвою матрицею. Домішки, такі як білки, солі та залишки клітин, видаляються під час наступних етапів промивання та центрифугування. Нарешті, високочищені нуклеїнові кислоти

вивільняються у розчин за допомогою буфера з низькою іонною силою. Очищену ДНК можна використовувати безпосередньо в подальших застосуваннях для діагностичних аналізів *in vitro*. Тривалість процедури виділення складає від 45 хв.

Обмеження щодо використання

- Набір RevoDx DNA Purification Kit from Blood повинен використовуватись тільки для діагностики *in vitro* чи в дослідницьких цілях
- Будь-які діагностичні результати, отримані у зв'язку з будь-яким наступним діагностичним аналізом із використанням цього набору, слід інтерпретувати відповідно до всіх відповідних клінічних і лабораторних результатів.
- Цей набір валідовано для використання зі свіжою або замороженою кров'ю людини, консервованою цитратом, гепарином або EDTA. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Надійні результати залежать від належного збору зразків, транспортування, зберігання та методів обробки.
- Набір повинен використовуватися лише професійним персоналом, навченим молекулярно-біологічним методам.
- Для досягнення оптимальних результатів очищення ДНК/РНК дотримуйтесь інструкції з використання до набору.
- Для діагностики та моніторингу пацієнта слід використовувати єдиний тип набору для екстракції. Якщо RevoDx DNA Purification Kit from Blood замінює інший набір для очищення НК, обидва набори слід використовувати паралельно протягом принаймні двох наступних досліджень.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних партій не можна змішувати.

Інформація щодо безпеки

- Усі отримані відходи слід вважати потенційно інфекційними. З ними слід поводитись та утилізувати відповідно до місцевих правил безпеки.
- Уникайте будь-якого контакту шкіри з реагентами набору. У випадку контакту ретельно промити водою.
- Уникайте розбризкування та утворення аерозолів.
- Після роботи із клінічними зразками та реагентами необхідно мити руки.
- Інформацію стосовно хімічного складу та безпечності реагентів тощо (MSDS information) можна отримати від виробника чи його представника за запитом.
- При роботі в лабораторії використовувати засоби індивідуального захисту
- На початку та в кінці роботи дезінфікуйте усі робочі поверхні знезаражувальними розчинами.
- Переконайтесь, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтесь з усіма матеріалами відповідно до правил роботи в лабораторіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами для запобігання перехресній контамінації.
- Використовуйте тільки перевірені/калібровані дозатори та наконечники з аерозольним фільтром.
- Одразу після використання слід щільно закривати кришки флаконів для перешкодження протікання і зміні концентрації реагентів.
- Зберігайте набір якомога далі від джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо продуктами ампліфікації.
- Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція нуклеїнових кислот, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).
- Усе обладнання та витратні матеріали для конкретної операції повинні знаходитися в зоні, де виконується ця операція, і не повинні переміщатися між різними зонами. Рукавички слід змінювати при переході у кожную зону. Лабораторні халати повинні бути окремими для кожної зони і їх не можна носити за межами цієї зони.
- Роботи повинні виконуватись в одному напрямку, починаючи із зони екстракції ДНК/РНК і закінчуючи відповідними зонами використання.

Додаткові матеріали та обладнання

- Етанол 96-100% (для молекулярно-біологічних досліджень),
- Термошейкер або твердотільний термостат (56°C - 95°C)

- Вихровий змішувач (вортекс),
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл (≥ 16 000 x g),
- Відповідні засоби індивідуального захисту (захисний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри)
- Мікропіпетки (дозатори) (0,5 мкл – 1000 мкл),
- Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром, вільні від ДНКаз та РНКаз (з маркуванням DNase/RNase-free),
- Мікропробірки 1,5/2 мл, вільні від ДНКаз/РНКаз,

Обробка зразків

Цей набір валідований для використання зі свіжою або замороженою кров'ю людини, консервованою цитратом, гепарином або ЕДТА.

З клінічними зразками слід поводитися як з потенційно інфекційними; під час відбору та обробки зразків рекомендується дотримуватися запобіжних заходів безпеки. Клініцисти (в тому числі фельдшери, медсестри, лікарі та фахівці, пов'язані з медициною) несуть відповідальність за дотримання правильної процедури під час відбору та безпечного транспортування зразків до лабораторії. Достовірність результатів тестування значною мірою залежить від належної практики на преаналітичному етапі, що також передбачає точне і повне документування.Транспортування біологічних зразків пов інно відповідати національним або місцевим правилам. Слід уникати повторних циклів заморожування/розморожування зразків.

Після збору не зберігайте цільну кров при кімнатній температурі довше 4 годин. Транспортування цільної крові має відповідати державним або місцевим нормам. Слід уникати повторних циклів заморожування/розморожування.

Зразки необхідно перемішати, перевертаючи пробірки або піпетуючи кілька разів перед перенесенням у пробірку для зразків. При використанні заморожених зразків, потрібно прогріти їх до кімнатної температури перед початком процедури.

Зауваження перед початком використання

Перед кожним використанням перевіряйте всі розчини з набору на наявність осаду. При виявленні осаду розчиніть його шляхом прогрівання до температури 37°C, а потім дайте охолонути до кімнатної температури. Заморожені зразки інкубуйте при 37°C, та дайте охолонути до кімнатної температури. Уникайте багаторазових циклів заморожування/розморожування зразків.

Всі етапи центрифугування слід виконувати при кімнатній температурі.

Перед першим використанням додайте вказаний об'єм етанолу (96-100%) до концентрованого буфера для промивання 1 і концентрованого буфера для промивання 2, як зазначено в таблиці нижче. Пляшки з розчином слід щільно закривати між використанням, щоб запобігти випаровуванню. На етикетці пляшок слід зазначити, що в них додано етанол.

Якщо будь-який розчин не проходить через центрифужну колонку, процентрифугуйте ще 1-2 хвилини до повного проходження через колонку.

	50 тестів	100 тестів
Буфер для промивання 1 (Wash Buffer 1)	додати 14 мл 96-100% етанолу (для молекулярної біології)	додати 28 мл 96-100% етанолу (для молекулярної біології)
Буфер для промивання 2 (Wash Buffer 2)	додати 7 мл 96-100% етанолу (для молекулярної біології)	додати 14 мл 96-100% етанолу (для молекулярної біології)

Примітка: етанол в чистомі вигляді також використовується при виділенні цим набором, див. Пункт 4 нижче.

Протокол

1. Внести по 20 мкл протеїнази К (Proteinase K) та по 200 мкл зразка у промарковані пробірки об'ємом 1,5-2 мл. *Примітка. Якщо кров була заморожена, розморозьте її при 37°C. Після додавання зразків не чекайте занадто довго, інакше вихід ДНК може зменшитися.*
2. Додати по 200 мкл Буфера для лізису (Lysis buffer) у кожну пробірку зі зразком та протеїназою К.
3. Ретельно перемішати вміст пробірок переривчастим вортексуванням. Помістити пробірки в термошейкер та інкубувати при 65°C протягом 15 хвилин з перемішуванням. Можна інкубувати в твердотільному

термостаті при 65°C протягом 15 хвилин, перемішуючи вміст пробірок кожні 2-3 хвилини.

4. Осадити краплі короткочасним центрифугуванням та додати 260 мкл 96-100% етанолу, перемішати переривчастим вортексуванням, знову осадити краплі центрифугуванням. Інкубувати 1 хв при кімнатній температурі
5. Перенести лізат до відповідно промаркованих спін-колонок, вставлених в пробірки для збору.
6. Центрифугувати при 6,000 x g протягом 1 хвилини. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
7. Додати у кожну колонку по 500 мкл Буфера для промивання 1 (Wash Buffer 1). Центрифугувати при 6,000 x g протягом 1 хвилини. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
8. Додати у кожну колонку по 500 мкл Буфера для промивання 2 (Wash Buffer 2). Центрифугувати при 16,000 x g протягом 1 хвилини. Перенести спін-колони в нові пробірки для збору, попередні викинути.
9. Центрифугувати при 16,000 x g протягом 3 хвилин. Перенести спін-колони в пробірки для зберігання елюату, попередні пробірки для збору викинути.
10. Прогріти Буфер для елюції (Elution Buffer) до 70°C. Внести по 50-200 мкл прогрітого Буфера для елюції в центр кожної спін-колони, закрити кришки та інкубувати 3 хв при кімнатній температурі.
11. Центрифугувати при 6,000 g протягом 1 хвилини, потім додатково центрифугувати при 16,000 g ще 30 секунд.
12. Вийняти спін-колони з пробірок та викинути колонки. Пробірки містять елюат з очищеною ДНК. Виділену ДНК використати незабаром після виділення, для довгострокового зберігання помістити її в морозильну камеру з температурами -20°C або -70°C.

Можливі проблеми та їх усунення

Проблема	Можливі причини	Рекомендації
Низький вихід НК	Випаровування етанолу з промивних буферів	Флакони з реагентами слід щільно закривати кришками між використаннями, щоб запобігти випаровуванню.
	Неналежне зберігання компонентів набору	Протеїназу К слід зберігати при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід щільно закривати та зберігати при кімнатній температурі (від 15 °C до 30 °C).
	Етанол не був доданий до Буферів для промивання	Перед першим використанням додати вказаний об'єм етанолу (96-100%) до концентратів буферів для промивання 1 та 2. На етикетці пляшок має бути вказано, що додано етанол.
	Неналежне поводження з вихідним матеріалом	Під час роботи з набором переконайтеся, що розхідні матеріали не містять ДНКаз/РНКаз
	Неналежне поводження з елюатами	Не піддавайте елюати численним циклам заморожування-розморожування перед подальшими аналізами
	Погана якість вихідного матеріалу	Уникайте багаторазових циклів заморожування/розморожування зразків.
	Неправильні умови елюції	Додайте 200 мкл буфера для елюції, попередньо нагрітого до 70°C, у центр центрифужної колонки, закрийте кришку спінової колонки та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3 хвилин
	Засмічена колонка	Якщо використовується більше 200 мкл

		зразка, збільште пропорційно об'єми протеїнази K, буфера для лізису та етанолу. Почергово пропустіть аліквоти лізату через одну колонку.
	Утворення осаду в реагентах	Перед кожним використанням перевіряйте всі розчини в наборі на наявність осаду. При утворенні осаду потрібно розчинити його, нагрівши розчин до 37°C, а потім довести до кімнатної температури
Низька продуктивність з наступним діагностичним набором	Потрапляння залишків етанолу до елюату	Обов'язково видалити весь залишковий етанол на етапі останнього промивання, оскільки він заважає подальшим аналізам
	Інгібування ПЛР	Тестування з іншими типами зразків може призвести до інгібування ПЛР
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників	Завжди міняйте наконечники між переносами рідини (рекомендовано наконечники з аерозольним бар'єром)
	Забруднення ампліконами	Тримайте набір подалі від будь-якого джерела забруднення нуклеїновими кислотами
		Усі маніпуляції варто проводити в окремих зонах (екстракція НК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація).

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Каталожний номер
RevoDx DNA Purification Kit from Blood	50 тестів	IP201909-50
RevoDx DNA Purification Kit from Blood	100 тестів	IP201909-100