

RevoDx Набір для виділення ДНК та РНК патогенних організмів на магнітних частинках

RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit

Інструкція з використання

Для виділення ДНК та РНК патогенів з біологічного матеріалу
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202303-50 – 50 тестів
IP202303-100 – 100 тестів



Склад набору

	Компонент	50 тестів	100 тестів
1	Буфер для лізису (Pathogen Lysis Buffer)	11 мл	22 мл
2	Буфер для осадження (Binding Buffer)	11 мл	22 мл
3	Буфер для промивання 1 (Wash Buffer 1)	14 мл	28 мл
4	Буфер для промивання 2 (Wash Buffer 2)	21 мл	42 мл
5	Буфер для елюції (Elution Buffer)	40 мл	80 мл
6	Протеїназа K (Proteinase K *)	1 пробірка	2 пробірки
7	Магнітні частинки (Magnetic beads)	1 пробірка	2 пробірки
8	Інструкція з використання (Product Manual)	1 шт	1 шт

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати за температури навколишнього середовища. Після отриманні вийміть пробірки з протеїназою K та магнітними частинками з упаковки та зберігайте при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід зберігати щільно закритими при кімнатній температурі (від 15°C до 25°C). За умови належного зберігання всі компоненти набору є стабільними до закінчення терміну придатності, який зазначений на етикетці продукту.

Передбачене використання

RevoDx Набір для виділення ДНК та РНК патогенних організмів на магнітних частинках призначений для швидкого очищення ДНК/РНК патогенів із цільної крові, рідких цитологічних матеріалів, урогенітальних/цервікальних/вагінальних мазків, спинномозкової рідини (СМР), транспортних середовищ (UTM/VTM), зразків сечі. Очищена ДНК/РНК придатна для подальших застосувань, таких як ПЛР, РЧ-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 згідно з усіма відповідними клінічними та лабораторними даними.

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 для очищення ДНК/РНК патогенів RevoDx передбачає використання спеціальних буферів для лізису в поєднанні з магнітними частинками 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 магнітними частинками. Домішки, такі як білки, солі та залишки клітин, видаляються під час наступних етапів промивання. 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 хвилин.

Обмеження щодо використання продукту

- RevoDx Набір для виділення ДНК та РНК патогенних організмів на магнітних частинках можна використовувати для діагностики *in vitro*.
- Будь-які діагностичні результати, отримані у зв'язку з будь-яким подальшим діагностичним аналізом з використанням цього набору, слід інтерпретувати згідно з усіма відповідними клінічними та лабораторними даними.
- Оскільки робочі характеристики цього набору не валідовані для конкретного мікроорганізму, користувач несе відповідальність за перевірку використання набору для певного діапазону застосувань.
- Цей набір валідований для використання з цільною кров'ю, рідинними цитологічними матеріалами, урогенітальними/цервікальними/вагінальними мазками, спинномозковою рідиною (CSF), транспортними середовищами (UTM/VTM), зразками сечі. Тестування з іншими типами зразків може призвести до неточних результатів.
- Надійні результати залежать від правильного збору, транспортування, зберігання та методів обробки зразків.
- Набір повинен використовуватися тільки професійним персоналом, який пройшов підготовку з молекулярно-біологічних методів.
- Дотримуйтесь вказівок, наведених в інструкції до набору, для отримання оптимальних результатів виділення.
- Для діагностики та моніторингу пацієнта слід використовувати один тип наборів для виділення. Якщо RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit замінює інший набір для виділення, обидва тести слід використовувати паралельно принаймні протягом двох наступних циклів.
- Не використовуйте набір після закінчення терміну придатності. Компоненти набору з різних партій не можна змішувати.

Інформація щодо безпеки

- Клінічні зразки слід розглядати як потенційно інфекційні; з ними слід працювати в зоні біобезпеки 1-го або 2-го рівня, залежно від збудника інфекції.
- 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 незаражувальними розчинами.
- Переконайтеся, що усі розхідні матеріали мають маркування DNase/RNase-free.
- Поводьтеся 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 кожну 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.

Додаткове обладнання та матеріали

- Етанол 96-100% (для молекулярно-біологічних досліджень),
- 2-пропанол (ізопропанол, для молекулярно-біологічних досліджень),
- Штатив для магнітної сепарації,

- Термошейкер або твердотільний термостат (56°C - 95°C),
- Вихровий змішувач (вортекс),
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл (≥ 10 000 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.

Поводження зі зразками

Цей набір валідований для виділення ДНК/РНК патогенів з цільної крові, зразків рідинної цитології, урогенітальних/цервікальних/вагінальних мазків, спинномозкової рідини (СМР), транспортних середовищ (UTM/VTM), зразків сечі. 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 повинно відповідати національним або місцевим правилам. Слід уникати повторних циклів заморожування/розморожування зразків.

Зауваження перед використанням

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.

	50 тестів	100 тестів
Буфер для промивання 1	додати 14 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)	додати 28 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)
Буфер для промивання 2	додати 7 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)	додати 14 мл 96-100% етанолу (Molecular biology grade)

Примітка: етанол в чистоті вигляді також використовується при виділенні цим набором, див. пункт 9 нижче.

Процедура

1. а) 3 цільної крові:
 - ✓ Центрифугувати 200 мкл цільної крові при 10 000 g протягом 2 хвилин.
 - ✓Надосадову рідину видалити, але залишити 50 мкл рідини на дні пробірки.
 - ✓Додати 500 мкл буфера для елюції та ресуспендувати осад за допомогою вортексування.
 - ✓Центрифугувати при 10 000 g протягом 2 хвилин.
 - ✓Видалити надосадову рідину, але залишити 50 мкл рідини на дні пробірки.
 - ✓Додати 200 мкл буфера для лізису та 20 мкл протеїнази K і ресуспендувати осад за допомогою вортексування.
- б) 3 інших біологічних матеріалів, таких як: рідинна цитологія, урогенітальний/цервікальний/вагінальний мазок, спинномозкова рідина (СМР), транспортні середовища (UTM/VTM), зразки сечі:
 - ✓Центрифугувати 1 мл зразка біологічного матеріалу при 10 000 g протягом 2 хвилин.
 - ✓Надосадову рідину видалити, але залишити 50 мкл рідини на дні пробірки.
 - ✓Додати 500 мкл буфера для елюції і ресуспендувати осад за допомогою вортексування.
 - ✓Центрифугувати при 10 000 g протягом 2 хвилин.
 - ✓Надосадову рідину видалити, але залишити 50 мкл рідини на дні пробірки. Додати 200 мкл буфера для лізису і 20 мкл протеїнази K та ресуспендувати осад за допомогою вортексування.

2. Помістити пробірки в термошейкер та інкубувати при 65°C, з безперервним перемішуванням протягом 20 хв. Якщо термошейкер недоступний, інкубувати пробірки в твердотільному термостаті при 65°C протягом 20 хвилин, перемішуючи кожні 2-3 хвилини.
3. Осадить краплі короточасним центрифугуванням, додати 200 мкл буфера для зв'язування (Binding buffer), 250 мкл 2-пропанолу (ізопропанолу) і 20 мкл магнітних частинок (Magnetic beads), перемішати (імпульсним вортексуванням). Інкубувати при кімнатній температурі, безперервно перемішуючи протягом 7 хв. Якщо шейкер недоступний, перемішувати пробірки кожні 2-3 хвилини.
4. Інкубувати на штативі для магнітної сепарації протягом 5 хвилин і видалити надосадову рідину.
5. Додати 500 мкл буфера для промивання 1 (Wash buffer 1) і інкубувати при кімнатній температурі, перемішуючи протягом 1 хвилини.
6. Інкубувати на штативі для магнітної сепарації протягом 1 хвилини та видалити надосадову рідину.
7. Додати 500 мкл буфера для промивання 2 (Wash buffer 2) та інкубувати при кімнатній температурі, перемішуючи протягом 1 хвилини.
8. Інкубувати на штативі для магнітної сепарації протягом 1 хвилини і видалити надосадову рідину.
9. Додати 500 мкл 96-100% етанолу та інкубувати при кімнатній температурі, перемішуючи протягом 1 хвилини.
10. Інкубувати на штативі для магнітної сепарації протягом 1 хвилини і видалити надосадову рідину.
11. Видалити залишки спирту підсушуванням. Для цього інкубувати пробірки з відкритими кришками 2-5 хв при 60-65°C.
12. Додати 100 мкл буфера для елюції (Elution buffer).
13. Помістити пробірки в термошейкер та інкубувати при 65°C, безперервно перемішуючи протягом 10 хвилин. Якщо термошейкер недоступний, інкубувати пробірки в твердотільному термостаті при 65°C протягом 10 хвилин, перемішуючи кожні 2-3 хвилини.
14. Інкубувати на штативі для магнітної сепарації протягом 1 хвилини і перенести елюат у нові пробірки. Використати очищену ДНК/РНК негайно або зберігайте при -20°C або -70°C.

Примітка: Після магнітної сепарації може утворитися в'язкий осад, який може потрапити в елюат. Не переносьте цей осад з елюатом, оскільки він може перешкоджати подальшим аналізам.

Можливі проблеми та їх усунення

Проблема	Можливі причини	Рекомендації
Низький вихід нуклеїнових кислот	Випарювання етанолу з буферів для промивання	Флакони з розчинами слід щільно закривати між використаннями, щоб запобігти випаровуванню.
	Неналежне зберігання компонентів набору	Після отримання набору, вийміть пробірки з протеїназою K та магнітними частинками з упаковки та зберігайте при температурі від +2°C до +8°C. Інші компоненти набору слід зберігати щільно закритими при кімнатній температурі (від 15°C до 25°C).
	Етанол не доданий до промивних буферів	Перед першим використанням додайте вказаний об'єм етанолу (96-100%) до концентрованих буферів для промивання 1 та 2. На етикетці пляшок повинно бути зазначено, що додано етанол
	Неправильне поведження з вихідним матеріалом	Переконайтеся, що всі розхідні матеріали вільні від ДНКаз та РНКаз (DNase/Rnase-free)
	Неправильне поведження з елюатами	Не піддавайте елюати багаторазовим циклам заморожування-розморожування перед наступними аналізами
	Низька якість вихідного матеріалу	Уникайте багаторазового заморожування/розморожування зразків.

	Утворення осаду в розчинах	Перед кожним використанням перевіряйте всі розчини з набору на наявність осаду. Розчиніть будь-який осад, нагріваючи розчин до 37°C, а потім охолодіть до кімнатної температури.
Погані показники при подальшому діагностичному аналізі	Потрапляння етанолу в елюат	Обов'язково видаліть весь залишковий етанол з останнього етапу промивання, оскільки він заважає подальшим аналізам і є сильним інгібітором ПЛР
	Інгібування ПЛР	Зразки плазми або сироватки крові, обробленої гепарином, можуть призвести до інгібування ПЛР
		Тестування з іншими типами зразків може призвести до інгібування ПЛР
Перехресна контамінація	Повторне використання наконечників для піпеток	Завжди міняйте наконечники піпеток між перенесеннями рідини (рекомендується використовувати наконечники з аерозольним бар'єром)
	Амплікони	Тримайте набір подалі від будь-яких джерел забруднення нуклеїновими кислотами, особливо від ампліфікованих нуклеїнових кислот
		В ідеалі операції повинні проводитися в трьох окремих зонах (екстракція НК, приготування реакційних сумішей, ампліфікація), щоб запобігти контамінації.

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit	50 тестів	IP202303-50
RevoDx Magnetic Pathogen DNA/RNA Purification Kit	100 тестів	IP202303-100