

RevoDx Набір для виділення ДНК та РНК патогенів із фекалій

RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit

Інструкція з використання

Для виділення ДНК та РНК патогенів із зразків фекалій
Для діагностики *in vitro*
Тільки для професійного використання

Каталожні номери:
IP202428-50 – 50 тестів
IP202428-100 – 100 тестів



Склад набору

	Назва компонента	50 тестів	100 тестів
1	Буфер для лізису (Stool 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)	6 мл	11 мл
6	РНК-носії (RNA Carrier)	1 пробірка	1 пробірка
7	Протеїназа К (Proteinase K)	1 пробірка	1 пробірка
8	Спін-колонки з пробірками для збору	50 штук	100 штук
9	Пробірки для збору, 2 мл	200 штук	400 штук
10	Пробірки для елюції, 1,5	50 штук	100 штук
11	Інструкція з використання (Product Manual)	1 шт	1 шт

Транспортування, зберігання та стабільність

Набори можна транспортувати за температури навколишнього середовища. Після отримання вийміть пробірки з протеїназою К та РНК-носієм 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 умов належного зберігання всі компоненти набору залишаються стабільними до закінчення терміну придатності, який зазначений на етикетці продукту.

Передбачене використання

RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit призначений для швидкого очищення ДНК та РНК патогенних мікроорганізмів зі зразків фекалій. Очищена ДНК придатна для подальших застосувань, таких як ПЛР, РЧ-ПЛР, ЗТ-ПЛР тощо. 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 RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit 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 х

Обмеження щодо використання продукту

- RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit 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 зі зразками фекалій. 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 Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit замінює інший набір, 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),
- Термошейкер або твердотільний термостат (56°C - 95°C),
- Вихровий змішувач (вортекс),
- Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл ($\geq 16\ 000 \times g$),
- 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 та РНК патогенних мікроорганізмів зі зразків фекалій.

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 чистій вигляді також використовується при виділенні цим набором, див. Пункт 8 нижче.

Протокол

1. Додати **200 мкл** буфера для лізису (Stool Lysis Buffer) та 50-200 мг зразка калу у промарковані пробірки об'ємом 1,5-2 мл, вільні від ДНКаз/РНКаз.
2. Внести по **20 мкл** протеїнази К (Proteinase K) та по **20 мкл** РНК-носія (Carrier RNA) у кожну пробірку, перемішати вміст пробірок короточасним вортексуванням.
3. Помістити пробірки в термошейкер та інкубувати за **65°C** протягом 20 хвилин із постійним перемішуванням. Можна інкубувати в твердотільному термостаті протягом 20 хвилин, перемішуючи вміст пробірок кожні 1,5-2 хвилини.
4. Центрифугувати лізат протягом **3 хв** при **18 000 x g**, щоб осадити будь-які тверді частки. Супернатант перенести в нову мікроцентрифужну пробірку 1,5-2 мл, вільну від ДНКаз/РНКаз.
5. Знову центрифугувати лізат протягом **3 хв** при **18 000 x g**. Супернатант перенести в нову мікроцентрифужну пробірку 1,5-2 мл.
6. Додати 200 мкл буфера для зв'язування та перемішати вміст пробірок короточасним вортексуванням.
7. Помістити пробірки в термошейкер та інкубувати **65°C** протягом **10 хв** із перемішуванням. Можна інкубувати в твердотільному термостаті протягом 10 хвилин, перемішуючи вміст пробірок кожні 1,5-2 хвилини.
8. Осадити краплі короточасним центрифугуванням та додати **250 мкл** 96-100% етанолу, перемішати переривчастим вортексуванням.
9. Осадити краплі короточасним центрифугуванням. Перенести лізат до відповідно промаркованих спіні-колонок, вставлених в пробірки для збору.
10. Центрифугувати при **6,000 x g** протягом **1 хв**. Перенести спіні-колоники в нові пробірки для збору, попередні викинути. *Примітка.* В спіні-колонках може залишатися візуально помітний осад. Він не впливає на ефективність виділення.
11. Додати у кожну колонку по **500 мкл** Буфера для промивання 1 (Wash Buffer 1). Центрифугувати при **6,000 x g** протягом 1 хвилини. Перенести спіні-колоники в нові пробірки для збору, попередні викинути.

12. Додати у кожну колонку по **500 мкл** Буфера для промивання 2 (Wash Buffer 2). Центрифугувати при **6,000 x g** протягом 1 хвилини. Перенести спін-колонки в нові пробірки для збору, попередні викинути.
13. Закрити кришки спін-колонок, центрифугувати при 16,000 x g протягом 3 хвилин. Перенести спін-колонки в пробірки для зберігання елюату (1,5-2 мл, рекомендуємо попередньо промаркувати), попередні пробірки для збору викинути.
14. Внести по **100 мкл** Буфера для елюції (Elution Buffer) в центр кожної спін-колонки, закрити кришки та інкубувати **3 хв** при кімнатній температурі.
15. Центрифугувати при 6,000 g протягом 1 хвилини, потім додатково центрифугувати при 16,000 g ще 30 секунд.
16. Вийняти спін-колонки з пробірок та викинути колонки. Пробірки містять елюат з очищеною ДНК та РНК. Виділену ДНК/РНК використати незабаром після виділення, для довгострокового зберігання помістити їх в морозильну камеру з температурами від -20°C до -70°C.

діагностичному аналізі		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.

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 К з упаковки та зберігайте при температурі від +2°C до +8°C, а пробірк з РНК-носієм – від -25°C до -15°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 поводження з вихідним матеріалом	Переконайтеся, що всі розхідні матеріали вільні від ДНКаз та РНКаз (DNase/Rnase-free)
	Неправильне поводження з елюатами	Не піддавайте елюати багаторазовим циклам заморожування-розморожування перед наступними аналізами
	Низька якість вихідного матеріалу	Уникайте багаторазового заморожування/розморожування зразків.
	Неправильні умови елюції	Додайте 50 мкл буфера для елюції, у центр спін-колонки, закрийте кришку колонки та інкубуйте при кімнатній температурі протягом 3 хвилин
Погані показники при подальшому	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.
	Потраплення 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

Інформація для замовлення

Назва продукту	Фасування	Кат.№.
RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit	50 тестів	IP202428-50
RevoDx Stool Pathogen DNA/RNA Purification Kit	100 тестів	IP202428-100