## B-Prep-100

**Набiр реагентiв для видiлення нуклеїнових кислот iз низькокопiйних зразкiв (100 реакцiй)**

ІНСТРУКЦІЯ ІЗ ВИКОРИСТАННЯ

**Призначення**

Набір реагентiв для видiлення нуклеїнових кислот iз низькокопiйних зразкiв «B-Prep-100» призначений для отримання високоочищених препаратів нуклеїнових кислот (ДНК/РНК) для подальшого їх застосування у дослідженнях різними методами на основі ПЛР. Можливе застосування набору ручним та автоматичним методом.

**Склад набору**

Набір реагентів «B-Prep-100» розрахований для виділення 100 зразків, не потребує жодних додаткових реагентів.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № | Назва компонента | Об’єм, мл |
| 1 | MBВ (Розчин магнітних часток) | 1 |
| 2 | Lysis Buffer В (Буфер для лізису) | 45 |
| 3 | Wash Buffer 1В (Буфер для промивання 1) | 45 |
| 4 | Wash Buffer 2В (Буфер для промивання 2) | 45 |
| 5 | Elution Buffer В (Буфер для елюції) | 12 |

**Принцип роботи**

У наборі реагентів «B-Prep-100» зразки лізуються в оптимізованому буфері із хаотропними солями у присутності магнітних часток, при чому відбувається селективне зв'язування ДНК/РНК з останніми. Білки, солі, залишки клітин та інші домішки видаляються під час двох етапів промивання. Нарешті, очищені нуклеїнові кислоти вивільняються у розчин за допомогою буфера з низькою іонною силою.

**Особливості застосування**

Набір може застосовуватись із наступними видами біоматеріалу:

* Мазки та зішкріби з цервікального каналу та уретри
* Виділення піхви
* Сперма, секрет простати
* Зішкріб з виразково-ерозивних елементів
* Сеча
* Амніотична рідина
* Плазма та сироватка крові
* Клітини крові
* Ліквор
* Синовіальна та плевральна рідини
* Мазки з ротоглотки і носоглотки
* Бронхоальвеолярний лаваж
* Слина
* Мазки і біоптати ШКТ
* Виділення кон’юктиви та змиви з ока
* Біоптати та аутопсати
* Кровосисні членистоногі (комахи, кліщі)
* Фекалії
* Зразки з навколишнього середовища

Набір можна застосовувати також із біоматеріалами, не передбаченими даним переліком, за умови проведення валідації лабораторією-користувачем.

Час виділення ручним методом складає близько 45 хв, автоматичним – 20 хв.

**Запобіжні заходи**

З усіма матеріалами необхідно поводитись відповідно до правил роботи в лаборіях, що проводять дослідження молекулярно-генетичними методами, щоб запобігти перехресній контамінації.

Для використання Набору з матеріалами, що можуть містити збудників інфекцій, лабораторія та її персонал мають відповідати вимогам Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторії при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» (Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 24 січня 2008 року № 26).

Для отримання достовірних результатів важливі правильні підготовка до забору, забір, зберігання та транспортування зразків. З рекомендаціями щодо поводження зі зразками можна ознайомитись у Наказі Міністерства охорони здоров'я України від 30 липня 2013 року №662 «Методичні рекомендації «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції»»

Усі пластикові розхідні матеріали повинні бути вільні від ДНКаз та РНКаз (з маркуванням DNase/RNase-free).

**Додаткове обладнання та матеріали**

* Ламінарний бокс ІІ класу захисту,
* Штатив для магнітної сепарації,
* Термошейкер або твердотільний термостат (70ºC),
* Вихровий змішувач (вортекс),
* Настільна мікроцентрифуга для пробірок 2,0 мл,
* Відповідні ЗІЗ (захисний халат, одноразові рукавички, захисні окуляри тощо)
* Мікропіпетки (дозатори) (10 мкл – 1000 мкл),
* Наконечники для дозаторів з аерозольним фільтром, вільні від ДНКаз та РНКаз (з маркуванням DNase/RNase-free),
* Мікропробірки 1,5/2 мл (для ручного методу виділення) або планшети/стрипи та гребінки, що підходять до станції для автоматичного виділення користувача. Усі пластикові розхідні матеріали повинні бути вільні від ДНКаз та РНКаз (з маркуванням DNase/RNase-free).

**Підготовка до роботи**

Провести попередню підготовку зразків, залежно від типу біоматеріалу (якщо потрібно, див. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 30 липня 2013 року №662 «Методичні рекомендації «Порядок забору, транспортування та зберігання матеріалу для дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції»»). Якщо зразки були заморожені, розморозити та ретельно перемішати.

*Якщо в лізуючому буфері утворився осад, його необхідно розчинити за допомогою прогрівання буфера до 60 ºC та перемішування. Розчин магнітних часток необхідно ретельно перемішати вортексуванням безпосередньо перед використанням.*

**Робота ручним методом**

* 1. Внесіть по 10 мкл розчину *магнітних часток* ***MBB*** в кожну пробірку (якщо в наборі для ПЛР не використовується екзогенний внутрішній контроль), або приготуйте суміш 10 мкл MBB та об’єму ВК, рекомендованого виробником набору ПЛР, та внесіть суміш відповідного об’єму (10 мкл + обє’м ВК) у пробірки об’ємом 1,5 або 2 мл.
  2. Додайте 100 мкл зразка в кожну пробірку. Додайте 100 мкл буфера для елюції до пробірки для негативного контролю екстракції.
  3. Додайте *450 мкл буфера для лізису* ***Lysis Buffer В***вкожну пробірку. Перемiшайте вмiст пробiрок та iнкубуйте при *65°С* протягом 5 хв при постiйному перемiшуваннi на термошейкері або перiодичному вортексуванні (кожнi 2-3 хв). Пiсля закiнчення iнкубацiї перемiшайте вміст пробірок на вортексi протгом 5 с.
  4. Осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Помiстiть пробiрки на магнітний штатив на 60 с. Обережно видалiть надосадову рiдину, не торкаючись магнiтного сорбенту.
  5. Додайте 450 *мкл буфера для промивання 1* ***Wash Buffer 1B*** та перемiшайте вмiст пробiрок на вортексi протягом 5 с.
  6. Осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Помiстiть пробiрки на магнітний штатив на 60 с. Обережно видалiть надосадову рiдину, не торкаючись магнiтного сорбенту.
  7. Додайте 450 *мкл буфера для промивання 2* ***Wash Buffer 2B*** та перемiшайте вмiст пробiрок на вортексi протягом 5 с.
  8. Осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Помiстiть пробiрки на магнітний штатив на 60 с. Обережно видалiть надосадову рiдину, не торкаючись магнiтного сорбенту. Важливо дуже ретельно відібрати залишки буфера, оскільки при потраплянні в елюат він інгібує ПЛР.
  9. Залиште пробірки на магнітному штативі з відкритими кришками на 2 хв для просушування магнітного сорбента.
  10. Додайте 50 *мкл буфера для елюції* ***Elution Buffer B*** й перемiшайте вмiст пробiрок на вортексi протягом 5 с. При необхідності об’єм буфера можна збільшити до 100 мкл.
  11. Інкубуйте при *65°С* протягом 5 хв при постiйному перемiшуваннi на термошейкері або перiодичному вортексуванні (кожнi 2-3 хв). Пiсля закiнчення iнкубацiї перемiшайте вміст пробiрок на вортексi протягом 5 с.
  12. Осадіть краплі короткочасним центрифугуванням. Помiстiть пробiрки на магнітний штатив на 2 хв. Обережно відберіть елюат і перенесіть у нові пробірки. Елюат містить виділену ДНК та РНК, готову для використання у подальших дослідженнях.

Зразки очищених нуклеїнових кислот можна зберігати протягом 24 годин при температурі від +4°C до +8°C, або протягом 1 року при температурі від -24°C до -18°C або при -80°C протягом тривалого часу.

**Робота автоматичним методом:**

**Для станцій Autopure-96 (Allsheng), KingFisher Flex (ThermoFisher Scientific), Nexor96 (Lepu Medical) та подібних:**

**1.** Внесіть по 10 мкл розчину магнітних часток ***MBB*** в лунки 1-го планшета (якщо в наборі для ПЛР не використовується екзогенний внутрішній контроль), або приготуйте суміш 10 мкл MBU та об’єму ВК, рекомендованого виробником набору ПЛР, та внесіть суміш відповідного об’єму (10 мкл + обє’м ВК) у лунки планшета.

**2.** Додайте 100 мкл зразка в кожну лунку 1-го планшета. Додайте 100 мкл буфера для елюції до лунки для негативного контролю екстракції.

**3.** Додайте 450 мкл буфера для лізису ***Lysis Buffer B*** в лунки 1-го планшета.

**4.** Додайте 450 мкл *буфера для промивання 1* ***Wash Buffer 1B*** в лунки 2-го планшета.

**5.** Додайте 450 мкл *буфера для промивання 2* ***Wash Buffer 2B*** в лунки 3-го планшета.

**6.** Додайте 100 мкл *буфера для елюції* ***Elution Buffer B*** в лунки 4-го планшета.

**7.** Встановіть усі планшети та гребінку у станцію.

**8.** Запрограмуйте станцію:

**а)** Інкубація зразка в 1-му планшеті протягом 5 хв при 65°C при постійному перемішуванні, вказати об’єм 600 мкл;

**b)** Інкубація зразка у 2-му планшеті протягом 2 хв без нагрівання при постійному перемішуванні, об’єм 450 мкл;

**c)** Інкубація зразка в 3-му планшеті протягом 2 хв без нагрівання при постійному перемішуванні, об’єм 450 мкл. Після цього кроку потрібне також просушування магнітного сорбента протягом 2 хв, оскільки Буфер для промивання 2 при потраплянні в елюат інгібує ПЛР. У приладах серії Autopure просушування задається командою «Очікування» («Wait»), для приладів KingFisher – командою «Просушування» («Dry»);

**d)** Інкубація зразка в 4-му планшеті протягом 5 хв при 65 °C при постійному перемішуванні, об’єм 100 мкл;

**e)** Збирання магнітного сорбента протягом 1 хвилини.

**9.** Запустіть програму.

**10.** Після завершення роботи пристрою в планшеті №4 містяться очищені РНК і ДНК, готові до використання у подальших дослідженнях.

Зразки можна зберігати протягом 24 годин при температурі від +4°C до +8°C, або протягом 1 року при температурі від -24°C до -18°C або при -80°C протягом тривалого часу. Для тривалого зберігання рекомендуємо перенести зразки у пробірки.

**Для станцій Autopure Mini, Autopure-32/32A, Autopure-48 (Allsheng), KingFisher Duo (ThermoFisher Scientific), Nexor32 (Lepu Medical) та подібних:**

Перед внесенням реагентів у планшет обов’язково перевірте, які рядки лунок планшета мають опцію підігрівання в даній моделі приладу – це необхідно для правильного внесення буферів для лізису та елюції. У багатьох приладах реагенти вносяться у «вертикальні» рядки 1-12, у KingFisher Duo – у «горизонатальні» А-Н. Таким чином, максимальна кількість зразків на один планшет для більшості приладів – 16, для KingFisher Duo – 12. Зазвичай підігрів мають рядки 1 і 7 (більшість приладів), або 2 і 8 (Autopure-32А), а також 6 та 12 (Autopure, Nexor). У програмному забезпеченні для таких станцій вказуються рядки 1-6, для рядків 7-12 виконується та ж програма у відповідних позиціях, тому надалі в інструкції дії будуть описані для рядків 1-6. У KingFisher Duo підігрів має лише рядок А, а для елюції використовується окремий стрип. Для позначення рядків планшета для KingFisher Duo використовуватимемо буквенні позначення.

**1.** Якщо в наборі для ПЛР використовується екзогенний внутрішній контроль (ВК), приготуйте суміш 10 мкл ***MBB*** та об’єму ВК, рекомендованого виробником набору ПЛР. Якщо ВК не використовується, просто внесіть по 10 мкл розчину магнітних часток MBU в лунки планшета з опцією підігріву, або внесіть суміш відповідного об’єму (10 мкл + об’єм ВК) у відповідні лунки планшета (1 чи 2 залежно від моделі приладу, чи А для KingFisher Duo).

**2.** Додайте 100 мкл зразків у відповідні лунки. Додайте 100 мкл буфера для елюції до лунки для негативного контролю екстракції.

**3.** Додайте 450 мкл буфера для лізису ***Lysis Buffer B*** в лунки для лізису.

**4.** Додайте 450 мкл *буфера для промивання 1* ***Wash Buffer 1B*** в лунки рядка 3 (або С).

**5.** Додайте 450 мкл *буфера для промивання 2* ***Wash Buffer 2B*** в лунки рядка 4 (або D).

**6.** Додайте 100 мкл *буфера для елюції* ***Elution Buffer B*** в лунки рядка 6 (або стрип для елюції для KingFisher Duo).

**7.** Встановіть планшет(и) та гребінку(и) у станцію. Для KingFisher Duo вставте гребінку в рядок Н.

**8.** Запрограмуйте станцію:

**а)** Інкубація зразка у відповідному рядку планшета протягом 5 хв при 65°C при постійному перемішуванні, вказати об’єм 600 мкл;

**b)** Інкубація зразка у рядку 3 (С) протягом 2 хв без нагрівання при постійному перемішуванні, об’єм 450 мкл;

**c)** Інкубація зразка у рядку 4 (D) протягом 2 хв без нагрівання при постійному перемішуванні, об’єм 450 мкл. Після цього кроку потрібне також просушування магнітного сорбента протягом 2 хв, оскільки Буфер для промивання 2 при потраплянні в елюат інгібує ПЛР. У приладах серії Autopure просушування задається командою «Очікування» («Wait»), для приладів KingFisher – командою «Просушування» («Dry»);

**d)** Інкубація зразка у рядку 6 (стрипі для елюції) протягом 5 хв при 65 °C при постійному перемішуванні, об’єм 100 мкл;

**e)** Збирання магнітного сорбента протягом 1 хвилини.

**f)** Для KingFisher Duo вкажіть лунку Н для забирання і скидання гребінки.

**9.** Запустіть програму.

**10.** Після завершення роботи пристрою в рядку 6 чи стрипі для елюції містяться очищені РНК і ДНК, готові до використання у подальших дослідженнях.

Зразки можна зберігати протягом 24 годин при температурі від +4°C до +8°C, або протягом 1 року при температурі від -24°C до -18°C або при -80°C протягом тривалого часу. Для тривалого зберігання рекомендуємо перенести зразки у пробірки.

**Транспортування та зберігання**

Виробник гарантує придатність Набору протягом 12 місяцівз дати виготовлення при дотриманні умов зберігання, транспортування та використання. Умови зберігання: компоненти набору зберігаються при температурі +2 ..+24 °С. Під час транспортування Набору дозволяється одноразове короткочасне зберігання (протягом 1-5 діб) при температурі +24..+37 °С. У разі навності пошкоджень пластикової упаковки набору, пошкоджень флаконів та ознак протікання реагентів, набір вважати непридатним для використання.