



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР»
для детекции амплифицированной ДНК/РНК методом геле-электрофореза

ТУ 21.10.60-115-51062356-2016

Для диагностики *in vitro*

Содержание

1.Назначение:.....	3
2.Состав набора	3
3.Меры предосторожности.....	3
4.Материалы и оборудование	4
5.Проведение анализа	4
6.Обеззараживание	6
7.Транспортирование.....	6
8.Хранение	6
9.Срок годности.....	6
Приложение 1. Лист вносимых изменений	7

1. Назначение:

Комплект реагентов для детекции ДНК методом гель-электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом свете. предназначен для определения и анализа продуктов амплификации.

2. Состав набора

Набор рассчитан на 55/110/240 определений. Состав набора приведен в таблице 1.

Таблица 1. Состав набора

Реактив	Описание	Количество		
		55	110	240
Буфер для электрофореза (однократный)	Порошок белого цвета	1 навеска	2 навески	4 навески
Агароза для электрофореза	Порошок белого цвета	1 навеска	2 навески	5 навесок
Бромистый этидий	Прозрачная оранжевая жидкость	0,1 мл	0,2 мл	0,5 мл

3. Меры предосторожности

Организация работы, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

- Выполнение работ должно осуществляться отдельным персоналом, не задействованным на других этапах проведения анализа в отдельном, изолированном помещении.

- Рабочая зона (помещение) обеспечивается необходимым количеством комплектов спецодежды (комбинезон или пижама, медицинский халат, шапочка, одноразовые латексные (резиновые) перчатки и сменная обувь). При работе в помещении детекции продуктов амплификации следует надевать одноразовые бахилы. Использование одежды из другой зоны запрещено. Рекомендуется использование одноразовой одежды.

- Надевание и снятие защитной одежды производят в предбоксах. В каждом из них должен быть отдельный комплект защитной одежды и обуви.

- Ежедневно в конце рабочего дня проводят текущую влажную уборку полов разрешенными к применению дезинфицирующими средствами.

- Рабочая зона должна быть обеспечена промаркированным набором уборочного инвентаря, не допускается использование индивидуального уборочного инвентаря для уборки других помещений лаборатории.

- Рабочая зона должна подвергаться ежедневному обеззараживанию ультрафиолетовым излучением после окончания работы в соответствии с руководством «Использование ультрафиолетового бактерицидного излучения для обеззараживания воздуха в помещениях» Р 3.5.1904-04., М.: 2005.

- Для инаktivации ампликонов применяют облучение ультрафиолетом. Для обработки поверхностей столов, оборудования, инструментов применяют 0,2 %-ный раствор ДП-2Т или аналогичные ему растворы, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке.

4. Материалы и оборудование

- Камера для горизонтального электрофореза (например «SE2», «Хеликон»)
- Источник постоянного тока с напряжением 5-400 В (например, Эльф-4, «ДНК-технология»)
- Ультрафиолетовый трансэлюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например «Биоком»)
- Видеосистема с цифровой камерой для регистрации результатов (например «Vilber Lourmat», «Биотест-1», «Biocard»)
- Микроволновая печь для плавления агарозы
- Колба коническая на 250-300 мл из термостойкого стекла для плавления агарозы
- Мерный цилиндр на 1 л для приготовления буфера для электрофореза
- Штатив для микропробирок на 0,5 мл
- Отдельная автоматическая пипетка на 10-40 мкл
- Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе
- Пластиковая емкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия
- Отдельный халат и одноразовые перчатки

5. Проведение анализа

5.1 Приготовление рабочего буфера и агарозного геля

- *Приготовление рабочего электрофорезного буфера.*

Навеску буфера для электрофореза (однократного) растворить в 1 л дистиллированной воды до полного растворения кристаллов (примерно 10 минут).

•* *Приготовление агарозного геля.*

Внимание: На всех этапах приготовления геля не допускается попадание пыли и ворса в рабочие растворы, так как это существенно ухудшает условия детекции.

Агарозу для электрофореза из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл, влить 100 мл буфера¹ для электрофореза. Суспензию агарозы довести до кипения на электроплитке или в микроволновой печи (2-3 минуты при мощности микроволновой печи 800 Вт). Раствор должен стать прозрачным и не содержать отдельных нерасплавленных частиц. Расплав охладить при комнатной температуре до 45–50°C.

В полученный раствор добавить 100 мкл бромистого этидия и перемешать.

Внимание: Бромистый этидий – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые; при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Все содержащие этидий бромистый реагенты перед утилизацией следует подвергать специальной обработке.

Выровнять столик для заливки гелей, залить охлажденный расплав на пластину так, так, чтобы толщина слоя расплава была не более 5 мм, а зубцы гребёнок были погружены не менее, чем на 3-4 мм. Не допускать образования воздушных пузырьков.

После полного застывания геля (обычно 30-40 мин при комнатной температуре) осторожно извлеките гребенки плавным движением вверх, стараясь не повредить образовавшиеся карманы.

Допускается хранение готовых гелей в плотно закрытых емкостях с небольшим количеством буфера для проведения электрофореза в течение недели при температуре 2–8°C.

5.2 Подготовка и проведение электрофореза

Заполнить камеру для электрофореза приготовленным буфером и поместить пластину с агарозным гелем в камеру. Раствор буфера должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3–5 мм.

Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла (если оно присутствует) по 10–15 мкл проб и внести в лунки геля. В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен К⁺ и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК (с комплектом не поставляется). Использовать отдельный наконечник для каждой пробы.

Для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации установить крышку камеры для электрофореза и подключить

¹ При необходимости допускается увеличение объема буфера до 120-150 мл

источник постоянного тока, соблюдая полярность. Электрофорез проводится в направлении от катода (–) к аноду (+) в течение 25–30 мин при напряженности электрического поля 10–5 В/см и длине камеры 20–30 см. Продолжительность проведения электрофореза определяется движением фронта красителей, входящих в состав буфера. Оранжевый краситель не должен выйти за пределы геля. Фронт ксиленилцианолового красителя должен пройти не менее 2 см.

После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока. Перенести гель на экран трансиллюминатора, расположив лунками вверх. Продукты амплификации видны в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящихся полос красно-оранжевого цвета.

Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

Учёт результатов провести согласно инструкции к комплекту реагентов для ПЦР-амплификации ДНК.

Внимание: При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

6. Обеззараживание

Отработанные гели и буфер из камеры поместить в пластиковую емкость на 5 л с плотно закручивающейся крышкой. Добавить 0,5 М раствор калия перманганата равный полученному объему и раствор 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешать и оставить при комнатной температуре на 4–6 ч. Затем нейтрализовать, для этого добавить 2,5 Н раствор натрия гидроксида в количестве равном объему раствора калия перманганата. Нейтрализованные реактивы можно сбросить в канализацию.

7. Транспортирование.

Транспортирование набора «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР», должно производиться всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 до 25°C.

8. Хранение

Комплект реагентов «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР» следует хранить при температуре от 18 до 25 °C в защищенном от света месте.

9. Срок годности.

Срок годности реагентов «ПЦР-ЭФ-ФАКТОР» 24 месяца. Набор реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Приложение 1. Лист вносимых изменений

Редакция	Место вносимых изменений	Суть вносимых изменений
Версия 1.1 от 16.10.2017	Пункт 2. Состав набора, таблица 1	Увеличен формат с 220 до 240 определений
	5.2 Подготовка и проведение электрофореза	По тексту: добавлено примечание