



Комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ

1 НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1 Настоящая инструкция распространяется на комплект реагентов для выделения фетальной ДНК из крови матери ПРОБА-НК-ФЕТ, далее по тексту комплект.
- 1.2 Комплект реагентов предназначен для выделения фетальной ДНК (ДНК плода) из крови матери.
- 1.3 Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1 Состав комплекта реагентов:

| Реактив | Количество пробирок или флаконов | Номинальный объём |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Лизирующий раствор¹ • Реагент для преципитации • Промывочный раствор №1 • Промывочный раствор №2 • Буфер для растворения • Депротенинизирующий раствор² • Отрицательный контрольный образец | 1 флакон 1 флакон 1 флакон 1 флакон 2 пробирки 1 пробирка 1 флакон | 15 мл 30 мл 25 мл 15 мл по 1,4 мл 1,0 мл 13,5 мл |

- 2.2 **Число анализируемых проб.** Комплект рассчитан для выделения фетальной ДНК из 50 анализируемых образцов (включая отрицательные контрольные образцы).

- 2.3 **Принцип метода.** Принцип действия основан на высвобождении нуклеиновых кислот под действием хаотропного агента, с последующим осаждением и очисткой нуклеиновых кислот от примесей.

- 2.4 **Время проведения выделения ДНК** – от 2 часов.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические ПЦР исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности», и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально опасные.

К работе с комплектом реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинико-диагностической лаборатории.

Подготовку и проведение исследования с использованием комплекта реагентов следует проводить в боксах биологической безопасности II или III класса биологической защиты.

Дозаторы, используемые при работе с комплектом, должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

При использовании комплекта реагентов в клинико-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Опасные компоненты в комплекте реагентов

| Компонент комплекта | ПРОБА-НК-ФЕТ |
|-----------------------------------|--|
| Лизирующий раствор | Нет опасных веществ |
| Реагент для преципитации | Нет опасных веществ |
| Промывочный раствор №1 | Изопропанол |
| Промывочный раствор №2 | Метилацетат |
| Буфер для растворения | Нет опасных веществ |
| Депротенинизирующий раствор | Нет опасных веществ |
| Отрицательный контрольный образец | Азид натрия <math><0,06\%</math> |

В состав комплекта входят реагенты, которые содержат **раствор изопропанола** (указание на риски: H225, H319, H336).

В состав комплекта входят реагенты, которые содержат **метилацетат** (указание на риски: H225, H319, H336).

¹ - При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется при прогревании лизирующего раствора при 65 °С.

² - При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в депротенинизирующем растворе, что не влияет на качество выделенной фетальной ДНК.

В состав комплекта входят реагенты, которые содержат **азид натрия** – консервант, в концентрации не более 0,06 %, что является безопасным для конечного пользователя.

H225 – Легковоспламеняющиеся жидкость и пары; H319 – вызывает раздражение глаз; H336 – Может вызывать сонливость и головокружение.

При работе с комплектом реагентов необходимо использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

Не использовать комплект реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов указанному в паспорте к комплекту;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов комплекта;
- по истечению срока годности комплекта.

Примечание - Комплект реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

4 **ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

При работе с комплектом реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ требуются следующие оборудование и материалы:

- центрифуга для пробирок объёмом 4,5 мл, с RCF не ниже 1150 g, например, центрифуга EBA 20 Hettich (3461g или 6000 об/мин);
- центрифуга для пробирок объёмом 1,5 мл, с RCF не ниже 17000 g, например, центрифуга HERAEUS pico17 (17 000 g или 13 300 об/мин);
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру от 65 °C до 98 °C;
- микроцентрифуга-вортекс, например, BioSan, Латвия или аналогичная;
- холодильник бытовой с морозильной камерой Стинол, Россия или аналогичный;
- насос с колбой–ловушкой для удаления надсадочных жидкостей;
- контейнер для замораживания, например, штатив IsoFreeze 24x1,5/2 мл, SSI, или штатив CoolRack M15, 15x1,5/2 мл, Biorcion, или другое аналогичное оборудование;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, например, SSI, США;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 200–1000 мкл, например, Eppendorf, Германия или аналогичные;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических дозаторов, свободные от РНКаз и ДНКаз, объёмом 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл, например, Ахуген, США или аналогичные;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА.

5 **АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ**

5.1 **Материал для исследования**

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

5.2 **Взятие цельной периферической крови**

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 4,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2-3 раза. Необходимый объём крови составляет 4,0 - 4,5 мл.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина и цитрата натрия в качестве антикоагулянта.

5.3 **Транспортирование и хранение исследуемого материала**

Рекомендуется начать обработку крови в первые два часа после ее взятия.

В случае невозможности проведения обработки крови в течение двух часов допускается её хранение при температуре от 18 °C до 25 °C не более 4-8 часов.

5.4 **Получение плазмы крови**

5.4.1 **Центрифугируйте пробирки с кровью при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C).**

5.4.2 **Промаркируйте необходимое количество пробирок объёмом 1,5 мл (по две для каждого исследуемого образца крови).**

5.4.3 **Не задавая нижнюю (клеточную) фракцию, отберите автоматически с дозатором по 900 мкл верхней фракции (плазма) и перенесите в две соответствующим образом промаркированные пробирки.**

ВНИМАНИЕ! Для выделения ДНК используется только одна пробирка! Вторая пробирка может быть заморожена при минус 20 °C и, при необходимости, использована для повторного выделения ДНК.

Полученная плазма готова для выделения фетальной ДНК.

До начала выделения пробирки с плазмой могут храниться при температуре от 4 °C до 8 °C в течение 8 часов.

При планировании выделения фетальной ДНК на следующий день или позже, пробирки с плазмой необходимо заморозить при минус 20 °C. Замороженная плазма может храниться не более 3 месяцев. Перед началом выделения по одной пробирке каждого образца необходимо разморозить при комнатной температуре.

6 **ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ПЛАЗМЫ**

Перед началом работы необходимо достать из холодильника комплект реагентов для выделения фетальной ДНК ПРОБА-НК-ФЕТ и протестировать отсутствие осадка в лизирующем растворе. В случае выпадения осадка лизирующий раствор следует прогреть при 65 °C до полного растворения осадка. Пробирку с депротеинизирующим раствором необходимо выдержать при комнатной температуре 15-20 минут, затем перемешать в течение 10–15 с и центрифугировать в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание - Выпадение небольшого количества осадка тёмно-синего цвета допустимо и не влияет на качество депротеинизирующего раствора.

На данном этапе используйте только наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз.

- 6.1 Подготовьте к выделению фетальной ДНК образцы плазмы, полученные в соответствии с п. 5.4 (при необходимости разморозьте при комнатной температуре).
- 6.2 Промаркируйте одну пробирку объемом 1,5 мл «К-» и внесите в неё 900 мкл отрицательного контрольного образца.
- 6.3 Добавьте в каждую предназначенную для выделения ДНК пробирку с плазмой и в пробирку «К-» по 18 мкл депротеинизирующего раствора.
ВНИМАНИЕ! Депротеинизирующий раствор обладает повышенной вязкостью, в связи с чем его необходимо набирать в наконечник пипетки в течение 3-5 с и наносить на стенку пробирки (отдельным наконечником для каждого образца).
- 6.4 Плотно закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 10-20 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 6.5 Термостатируйте при температуре 98 °С в течение 5 мин.
ВНИМАНИЕ! При прогревании пробирок возможно открывание крышек! Рекомендуется использовать пробирки с защёлкивающимися крышками (например, Eppendorf Safe-Lock Tubes) или программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, термостат «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Примечание - В случае если не используется специализированный штатив, необходимо подготовить ледяную баню. Ледяная баня состоит из ёмкости, в которую насыпается кусковой лёд из воды, помещается штатив для пробирок с открытым дном и наливается холодная вода. Ледяная смесь не должна доходить до крышек пробирок приблизительно 5 мм.

- 6.6 Поместите пробирки в охлаждающий штатив на 10 мин.
ВНИМАНИЕ! Пробирки необходимо перенести в штатив сразу после термостатирования! Хранение пробирок не допускается, поскольку может привести к получению недостоверных результатов.
- 6.7 Осушите пробирки бумажной салфеткой. Центрифугируйте пробирки при 13 300 об/мин в течение 25 мин при комнатной температуре.
- 6.8 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца (К-) по новой пластиковой пробирке объемом 1,5 мл.
- 6.9 Отберите по 300 мкл супернатанта (из пробирки, маркированной «К-», 300 мкл раствора) и перенесите в соответствующие промаркированные пробирки.
ВНИМАНИЕ! Если объём супернатанта менее 300, но более 100 мкл, отберите и перенесите весь объём. Если объём супернатанта менее 100 мкл, то, возможно, предыдущие этапы выделения фетальной ДНК проведены некорректно (неправильные условия хранения крови или плазмы, несоответствие скоростных и временных условий центрифугирования образцов, несоблюдение температурных режимов). В этом случае необходимо провести повторное выделение фетальной ДНК из дополнительной пробирки с плазмой или повторное взятие крови у пациентки.
- 6.10 Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Закройте крышки пробирок.
- 6.11 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с, осадите капли центрифугированием на вортексе в течение 30 с.
- 6.12 Термостатируйте пробирки при температуре 65 °С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием на вортексе в течение 30 с.
- 6.13 Добавьте в каждую пробирку по 600 мкл реагента для преципитации, встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
ВНИМАНИЕ! После добавления реагента для преципитации, пробирки необходимо выдержать в горизонтальном положении в течение 7-10 мин, однократно встряхнув на микроцентрифуге-вортексе в течение этого времени.
- 6.14 Центрифугируйте пробирки при 13 300 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре.
- 6.15 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.16 Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.17 Центрифугируйте пробирки при 13 300 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 6.18 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.19 Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2 и перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.20 Центрифугируйте пробирки при 13 300 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре.
- 6.21 Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость (отдельным наконечником из каждой пробирки).
- 6.22 Откройте крышки пробирок и высушите осадок при температуре 65 °С в течение 1 мин.
- 6.23 Добавьте к осадку 35 мкл буфера для растворения, закройте крышки и прогрейте пробирки при температуре 65 °С в течение 10 мин. Перемешайте на вортексе в течение 3-5 с.
- 6.24 Осадите капли центрифугированием пробирок при 13 300 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

Полученный препарат фетальной ДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание - Полученный препарат фетальной ДНК будет содержать небольшое количество геномной ДНК матери.

Препарат фетальной ДНК можно хранить при температуре минус 20 °С не более 3 месяцев или при температуре минус 70 °С не более одного года.

7 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

7.1 Транспортирование

- 7.1.1 Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав комплекта.

- 7.1.2 Комплекты реагентов, транспортируемые с нарушением температурного режима, применению не подлежат.
- 7.2 Хранение**
- 7.2.1 Комплект реагентов следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.
- Примечание** - При хранении допускается выпадение небольшого осадка в лизирующем и депротеинизирующем растворе.
- 7.2.2 Комплекты реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.
- 7.3 Указания по эксплуатации**
- 7.3.1 Комплект реагентов должен применяться согласно действующей версии утверждённой инструкции по применению.
- 7.3.2 После вскрытия упаковки компоненты комплекта следует хранить при следующих условиях:
– компоненты комплекта следует хранить в течение всего срока годности при температуре от 2 °С до 8 °С в холодильных камерах или в холодильниках.

8 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

- 8.1 Комплекты, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности и неиспользованные реактивы, подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.
- 8.2 Компоненты комплекта реагентов с наличием предупредительных знаков об опасности следует уничтожать с соблюдением соответствующих мер безопасности в соответствии с действующим законодательством Российской Федерации.
- 8.3 Жидкие компоненты, входящие в состав комплекта реагентов, пришедшие в непригодность перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой в соотношении 1:100.
- 8.4 Непригодные для использования комплекты реагентов, упаковка комплектов реагентов (пробирки, флаконы, полиэтиленовые пакеты с замком и коробки из картона) относятся к отходам класса А и утилизируются с бытовыми отходами.

9 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ:

- 9.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта реагентов требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.
- 9.2 Срок годности комплекта - 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

10 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов ПРОБА-НК-ФЕТ, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:
http://www.dna-technology.ru/customer_support/

Адрес производителя:

ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Место производства:

Код изготовителя указан на этикетке (см. последнюю цифру в серии комплекта):

1. ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, 142281, Московская обл., г. Протвино, ул. Железнодорожная, д. 20.

2. ООО «ДНК-Технология ТС», Россия, 117246, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 4.

Символы, используемые при маркировке комплекта реагентов

|  | Только для in vitro диагностики |  | Дата производства | Символы и обозначения опасности при маркировке комплекта реагентов | |
|---|---------------------------------|---|---|---|--|
|  | Температурный диапазон |  | Содержит инструкцию по применению |  | Осторожно! Обратитесь к инструкции по применению |
|  | Количество определений |  | Каталожный номер |  | Легковоспламеняемое |
|  | Годен до |  | Адрес производителя |  | Вызывает раздражение глаз |
|  | Серия набора |  | Не допускается воздействие солнечного света |  | Содержит азид натрия не более 0,06% |