

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот  
из образцов почвы

«Почва-Экспресс»

ИНСТРУКЦИЯ по применению

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

### **1.1 Полное название**

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов почвы «Почва-Экспресс»

### **1.2. Назначение**

Набор реагентов «Почва-Экспресс» производства компании ООО «Синтол» идеально подходит для быстрого выделения нуклеиновых кислот (НК) из почвы и прочих образцов, содержащих гуминовые кислоты, которые являются очень сильным ингибитором всех ферментативных реакций.

Выделение данным набором не требует дорогостоящего специализированного оборудования и любых дополнительных реактивов. Набор не содержит опасных летучих химических веществ, таких как хлороформ, бензол, фенол и пр. Пригоден для работы со сложными для выделения образцами с большим количеством ингибиторов (гуминовые кислоты, вторичные метаболиты).

### **1.3. Область применения**

Набор для выделения «Почва-Экспресс» может быть использован в лабораторных центрах и институтах, для выделения НК из образцов почвы с целью последующей ПЦР-амплификации специфического участка изолированных НК или с диагностической целью с использованием коммерческих тест-систем ПЦР-РВ.

## **2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА**

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «Почва-Экспресс» не требует технического обслуживания и калибровки.

### **2.1 Состав набора**

#### **2.1.1 Набор реагентов «Почва-Экспресс»**

Набор реагентов «Почва-Экспресс» рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	Объем, мл	Количество, шт.
1	Лизирующий буфер	Бесцветная жидкость (возможно образование кристаллов при охлаждении)	40	1
2	Осаждающий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1
3	Сорбент	Суспензия с осадком серо-белого цвета	2,5	1
4	Промывочный раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1
5	Промывочный раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1
6	Промывочный раствор 3	Прозрачная бесцветная жидкость	25	1
7	Элюирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1

## 2.2 Ограничения

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «Почва-Экспресс» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию).

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке материала эффективность выделения НК может быть недостаточной и/или привести к ингибированию при последующем анализе методом ПЦР (ложноотрицательный результат). Ложноотрицательный результат ПЦР выявляется с помощью внутреннего положительного контрольного образца ДНК (или других аналогичных контрольных компонентов, входящих в коммерческие наборы), содержащегося реакционной ПЦР-смеси.

Для исключения возможной контаминации, возникающей вследствие ошибок персонала лаборатории при работе с набором и приводящей к получению ложноположительного результата при последующем анализе методом ПЦР-РВ, используются отрицательные контрольные образцы выделения.

## 3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Работу проводят в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

Потенциальный риск применения набора – класс 2а. Необходимо одновременное обеспечение и соблюдение персоналом правил биологической безопасности и требований к организации и проведению данных работ с целью предотвращения контаминации нуклеиновыми кислотами исследуемых проб, помещений и оборудования.

### 3.1 Необходимость обучения персонала

Для работы с данным набором реагентов необходимо участие специалиста с высшим или средним медицинским или биологическим (ветеринарным) образованием, получившим

дополнительное специальное образование на курсах повышения квалификации по молекулярно-биологическим методам диагностики. Персонал должен иметь навыки работы с биохимическими реактивами и современным лабораторным оборудованием.

### **3.2 Меры безопасности, позволяющие предохранять оператора**

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными, вредного влияния на организм оператора не оказывают. При работе с набором следует соблюдать обычные меры предосторожности для лабораторий:

- пользоваться лабораторными перчатками и надевать лабораторные халаты;
- не принимать пищу, пить или курить в лабораторных помещениях;
- после работы с пробами и реактивами следует тщательно вымыть руки водой с мылом.

Избегать контакта с кожей, глазами и слизистыми оболочками, при попадании на них компонентов набора промыть большим количеством воды. При приеме внутрь компонентов набора реагентов за медицинской помощью следует обратиться немедленно.

Компоненты набора промывочный раствор 2 и 3 (реагенты 5, 6) содержит легковоспламеняющиеся жидкости. Все работы с легковоспламеняющимися жидкостями должны проводиться с использованием приточно-вытяжной вентиляции, вдали от огня и источников искрообразования, электрооборудование и освещение должно быть взрывобезопасно.

## **4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ**

### **4.1 Указания о необходимости использования специального оборудования**

Работу с набором следует проводить в шкафу биологической безопасности (ШББ) 2 класса (например, БМБ-II-«Ламинар-С-1,5», ЗАО «Ламинарные системы», г. Миасс, Россия), установленном в рабочей зоне 2 (МУ 1.3.2569-09).

### **4.2 Дозирующие устройства**

Набор автоматических пипеток переменного объема на 20-200 мкл и 100-1000 мкл;

штатив для данных пипеток.

### **4.3 Другое используемое оборудование**

#### **4.3.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК**

*Ручная гомогенизация без применения жидкого азота:*

Стерильные ступки и пестики для гомогенизации;

весы с точностью от 0,01 г;

микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»);

штативы для микропробирок на 1,5 мл;

холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

*Ручная гомогенизация с применением жидкого азота*

Стерильные ступки и пестики для гомогенизации;

весы с точностью от 0,01 г;  
сосуд Дьюара;  
термос (для временного хранения жидкого азота);  
штативы для микропробирок на 1,5 мл;  
холодильник на 2-8 °С (для хранения образцов).

#### *Автоматическая гомогенизация*

Ротационный гомогенизатор Precellys Evolution (IBertintechnologies, Франция) или аналогичный.

Пробирки с шариками для гомогенизации

#### **4.3.2 Для выделения НК**

Твердотельный термостат для пробирок типа «Эппендорф» с возможностью поддержания температурного режима в диапазоне 25-100 °С для пробирок объемом 1,5-2 мл (например, «Циклотемп-303»);

центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл до 13 тыс. об/мин (например, Eppendorf 5424);

микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок (например, «Циклотемп-901»);

отсасыватель медицинский (например, ОМ-1);

штативы для наконечников и микропробирок объемом 1,5 и 2 мл.

#### **4.4 Лабораторная посуда**

Емкости для сброса наконечников и микропробирок.

#### **4.5 Материалы и реагенты, не входящие в состав набора**

##### **4.5.1 Для подготовки образцов (гомогенизации) к выделению НК**

Стерильные одноразовые пинцеты;

микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

одноразовые медицинские халаты и одноразовые медицинские перчатки;

комплект средств для обработки рабочего места.

##### **4.5.2 Для выделения НК**

Микропробирки типа «Эппендорф» объемом 1,5-2 мл;

Одноразовые пипетки Пастера объемом 1-3,5 мл (при отсутствии отсасывателя медицинского);

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 1000 мкл;

Отдельный халат и одноразовые медицинские перчатки;

Комплект средств для обработки рабочего места.

## **5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ПРОБЫ**

При использовании набора в качестве исследуемого материала может быть любой материал, содержащий гуминовые кислоты, предназначенный для последующих манипуляций с выделенной НК.

## 5.1 Предварительная подготовка биологического материала

### 5.1.1. Пробоподготовка почвы

#### 5.1.1.1 Пробоподготовка почвы без этапа гомогенизации

1. Навеску образца 200 мг поместить в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

#### 5.1.1.2 Ручная гомогенизация без использования жидкого азота

1. Переместить исследуемый материал в стерильную ступку.
2. Гомогенизировать необходимое количество образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы
3. Перенести 200 мг гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

**Примечание:** во избежание контаминации после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим хлорсодержащим средством.

#### 5.1.1.3 Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый материал в стерильную ступку.
2. Добавить в ступку с образцом жидкий азот до уровня 1 см от дна ступки.
3. Инкубировать 10 сек.
4. Гомогенизировать необходимое количество образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
5. Перенести 200 мг гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.

**Примечание:** после проведения ручной гомогенизации необходимо обрабатывать ступки и пестики дезинфицирующим средством, содержащим активный хлор.

#### 5.1.1.4 Автоматическая гомогенизация

1. Приготовить пробирки 2 мл с навеской керамических бусин для гомогенизации.
2. Поместить навеску исследуемого материала 200 мг в приготовленные пробирки для гомогенизации с навеской керамических бусин.

**Примечание:** перед выделением НК следует убедиться в отсутствии осадка в реагенте №1. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 30-60°C до полного растворения осадка.

3. Добавить 800 мкл лизирующего буфера (реагент №1) в подготовленные пробирки для гомогенизации.
4. Гомогенизировать по программе **10000rpm/15sec pause 30sec 4 повтора**, в случае использования гомогенизатора Precellys Evolution Bertin Technologies.

**Примечание:** проверьте эффективность гомогенизации образца – не должно присутствовать крупных цельных частей. В случае недостаточной гомогенизации необходимо повторить пункт 4 этапа **Пробоподготовка Автоматическая гомогенизация**

## 6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом необходимо включать отрицательный контроль выделения (ОКО-В) (1 на 5 исследуемых образцов), который потом обязательно анализируется в ПЦР вместе с другими образцами. Это позволит контролировать возможную контаминацию на этапе выделения НК.

## 6.1 Лизис и осаждение:

*Примечание:* перед выделением НК следует убедиться в отсутствии осадка в реагенте №1 и №2. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 30-60°C до полного растворения осадка.

1. Добавить 800 мкл лизирующего буфера (**реагент №1**) в каждую пробирку (за исключением пробирок, прошедших этап «Автоматическая гомогенизация»).
2. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 65°C в течение 60 минут в термостате, периодически встряхивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
3. Вынуть пробирки из термостата, интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе. Инкубировать при комнатной температуре 2 минуты.
4. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин 3 минуты.
5. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать необходимое количество новых 1,5 мл микроцентрифужных пробирок. Внести в каждую по 500 мкл осаждающего раствора (**реагент №2**) и 50 мкл сорбента (**реагент №3**).
6. Аккуратно, не задевая осадок, перенести 500-600 мкл супернатанта после центрифугирования в подготовленные пробирки с осаждающим раствором и сорбентом. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе. Инкубировать 5 минут при 65°C, периодически встряхивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
7. Вынуть пробирки из термостата
8. Центрифугировать пробирки при 5000 об/мин в течение 2-х минут.
9. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя, дозатора или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент!**

## 6.3 Промывка НК

1. Добавить к сорбенту 500 мкл промывочного раствора 1 (**реагент №4**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата кремниевых частиц.

*Примечание:* В связи с наличием сложных образцов с высоким содержанием гуминовых кислот, кремниевые частицы могут изменять свою окраску на коричневый или красный цвет, который обесцвечивается в процессе промывки.

При слипании сорбента необходимо разрушить конгломерат кремниевых частиц с помощью микроцентрифуги-встряхивателя, интенсивность перемешивания может быть увеличена, однако необходимо избегать механического повреждения пробирок.

2. Инкубировать 30 секунд при комнатной температуре, периодически встряхивая на микроцентрифуге-встряхивателе.
3. Центрифугировать 5000 об/мин 60 секунд.
4. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент!**
5. Добавить 500 мкл промывочного раствора 2 (**реагент №5**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата кремниевых частиц.
6. Центрифугировать 5000 об/мин 60 секунд.
7. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент.**
8. Добавить 500 мкл промывочного раствора 3 (**реагент №6**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата кремниевых частиц.
9. Центрифугировать 5000 об/мин 60 секунд.

10. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент**

11. Установить пробирки с открытыми крышками в термостат. Инкубировать 5-7 минут при 65°C до полного испарения промывочного раствора.

12. Через 5 минут начинать проверку пробирок с сорбентом на степень высушивания. Для этого каждую пробирку закрыть и вынуть из термостата. Если сорбент на дне пробирки потрескался, необходимо проверить на наличие паров ацетона. Если чувствуется запах ацетона, то пробирки необходимо снова установить в термостат для продолжения сушки с открытыми крышками до 10 минут или до исчезновения запаха ацетона.

#### **6.4 Элюция НК**

1. Вынуть пробирки с полностью высохшим сорбентом из термостата.

2. Добавить 200 мкл элюирующего раствора (**реагент №7**) в пробирки с высушенным сорбентом.

3. Перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

4. Инкубировать при 65°C в течение 10 минут в термостате перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата.

6. Центрифугировать 13000 об/мин 3 минуты.

7. Подготовить 1,5 мл чистые микроцентрифужные пробирки и промаркировать их.

8. Перенести супернатант в объеме 180 мкл в новые 1,5 мл пробирки, не задевая осадок кремниевых частиц.

**Примечание:** в случае забора кремниевых частиц рекомендуем повторить пункты 6-8 этапа **Элюция НК**. Наличие сорбента в элюате уменьшает качество и срок хранения раствора НК, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.)

#### **6.5. Условия хранения выделенных образцов НК**

Раствор ДНК может храниться при температуре от 2 до 8°C в течение 5 суток и при температуре не выше минус 16°C в течение года.

### **7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ**

#### **7.1 Условия хранения**

Набор реагентов «Почва-Экспресс» хранить при температуре от плюс 18 до плюс 25 °C в сухом защищенном от света месте.

#### **7.2 Условия транспортирования**

Транспортирование набора реагентов «Почва-Экспресс» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 18 до плюс 25 °C.

#### **7.3 Срок годности**

Срок годности составляет 6 месяцев с даты выпуска предприятием-изготовителем. Серии наборов реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежат. Срок годности вскрытых реагентов соответствует сроку годности, указанному на этикетках для невскрытых реагентов, если в инструкции не указано иное.



#### **7.4 Информация по безопасной утилизации**

Использованные пробирки, наконечники, перчатки, ветошь для обработки поверхностей в ШББ, собирают в пластиковые закрывающиеся емкости, выносят в специально предназначенное вспомогательное помещение (МУ 1.3.2569-09) с целью последующей инактивации, согласно требованиям, СанПиН 2.1.7.2790-10.

Наборы с истекшим сроком годности, а также в случае повреждения упаковки, утилизируют по классу Г, как токсикологически опасные отходы 1-4 классов опасности (СанПиН 2.1.7.2790-10).

#### **7.5 Гарантийные обязательства производителя**

Предприятие-производитель гарантирует соответствие функциональных характеристик набора требованиям, указанным в технической и эксплуатационной документации, в течение установленного срока годности (6 месяцев) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и применения.

Рекламации на качество набора реагентов «Почва-Экспресс» направлять на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42, тел. (495)984-69-93, факс.(499)977-74-55 E.mail: syntol@syntol.ru).

При выявлении побочных действий, не указанных в инструкции по применению набора реагентов, нежелательных реакций при его использовании, фактов и обстоятельств, создающих угрозу жизни и здоровью граждан и лабораторных работников при применении набора реагентов, рекомендуется направить сообщение на предприятие-изготовитель ООО «Синтол» по адресу, указанному выше, и в уполномоченную государственную регулирующую организацию в соответствии с действующим законодательством.