

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот
из образцов почвы, ила, гнили и прочих образцов,
содержащих гуминовые кислоты
«МетаГен/MetaGen»

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1. НАЗНАЧЕНИЕ



Новая линейка продуктов EasyWay производства компании «СИНТОЛ» – простые и быстрые наборы для манипуляций с ДНК/РНК различного назначения. Данные наборы разработаны с учетом тенденции мировых практик и методик по работе с нуклеиновыми кислотами. Используя достижения десятков исследователей по всему миру, нашими разработчиками были усовершенствованы и выведены формулы простых и качественных методов манипуляций с ДНК/РНК, которые не только сэкономят ваше время и средства, но и позволят достигнуть отличных результатов!

1.1 Полное название

Набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов почвы, ила, гнили и прочих образцов, содержащих гуминовые кислоты «МетаГен/MetaGen»

1.2. Назначение

Набор реагентов «МетаГен/MetaGen» производства компании «СИНТОЛ» идеально подходит для быстрого выделения нуклеиновых кислот (НК) из образцов почвы, ила, гнили и прочих образцов, содержащих гуминовые кислоты, которые являются очень сильным ингибитором всех ферментативных манипуляций с НК – ПЦР, рестрикция и пр. 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 (чернозем, гниль и пр.) с большим количеством ингибиторов (гуминовые кислоты, вторичные метаболиты бактерий и грибов и др.). Выделение образца занимает 60 минут без учета этапа пробоподготовки.

1.3. Область применения

Набор для выделения «МетаГен/MetaGen» 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, а также пригоден для исследований в области метагеномики.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «МетаГен/MetaGen» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор реагентов «МетаГен/MetaGen»

Набор реагентов «МетаГен/MetaGen» рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

№	Реагент/вспомогательный материал	Описание	Объем, мл	Количество, шт.
1	Лизирующий раствор	Бесцветная жидкость с творожным осадком	35	1
2	Осаждающий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	6	1
3	Осаждающий буфер	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	45	1
4	Сорбирующий раствор	Суспензия с осадком серо-белого цвета	3	2
5	Промывочный раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость	80	1
6	Промывочный раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1
7	Буфер для элюции	Прозрачная бесцветная жидкость	7	1

2.2 Ограничения

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «**МетаГен/MetaGen**» 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 1 и 2 (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;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл;

Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема без аэрозольного барьера до 200 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.

Рекомендованные количества образца

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг	
	Без этапа гомогенизации / автоматическая гомогенизация	Ручная гомогенизация
Земля	250-300	750-900
Ил	200-250	600-750
Гнилой образец*	150-200мг	450-600

* - этап гомогенизации обязателен

5.1 Предварительная подготовка биологического материала

5.1.1. Пробоподготовка земли и/или ила

5.1.1.1 Пробоподготовка земли/ила без этапа гомогенизации

1. Навеску образца (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») поместить в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

5.1.1.2 Ручная гомогенизация без использования жидкого азота

1. Переместить исследуемый материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в стерильную ступку.

2. Гомогенизировать необходимое количество образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы

3. Перенести 300 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 (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») 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 300 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 (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в приготовленные пробирки для гомогенизации с навеской керамических бусин.

Примечание: Перед использованием лизирующего раствора (**реагент №1**), его необходимо перемешать трехкратным переворачиванием флакона до получения гомогенной суспензии.

3. Добавить 600 мкл лизирующего раствора (**реагент №1**) в подготовленные пробирки для гомогенизации. Каждый забор раствора желательно сопровождать однократным пипетированием с целью избежания осаждения взвеси.

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**

5.1.2 Пробоподготовка гнилых образцов

5.1.2.1 Ручная гомогенизация без применения жидкого азота

1. Переместить исследуемый материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.

2. Гомогенизировать необходимое количество образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы.

3. Перенести 80 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.

5.1.2.2 Автоматическая гомогенизация

1. Приготовить пробирки 2 мл с навеской керамических бусин для гомогенизации.

2. Поместить при помощи стерильного одноразового пинцета навески исследуемого материала (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в приготовленные пробирки для гомогенизации с навеской керамических бусин.

Примечание: Перед использованием лизирующего раствора (**реагент №1**), его необходимо перемешать трехкратным переворачиванием флакона до получения гомогенной суспензии.

3. Добавить 600 мкл лизирующего раствора (**реагент №1**) в подготовленные пробирки для гомогенизации. Каждый забор раствора желательно сопровождать однократным пипетированием с целью избежания осаждения взвеси.

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**

5. Приступить к пункту 2 этапа «**Лизис и осаждение**»

5.1.2.3 Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета 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 80 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.

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 ДНК/РНК.

6.1 Лизис и осаждение:

Примечание: Перед использованием лизирующего раствора (**реагент №1**), его необходимо перемешать трехкратным переворачиванием флакона до получения гомогенной суспензии.

1. Добавить 600 мкл лизирующего раствора (**реагент №1**) в каждую пробирку (за исключением пробирок, прошедших этап «Автоматическая гомогенизация»). Каждый забор раствора желательно сопровождать однократным пипетированием с целью избежать осаждения взвеси.

2. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 70°C в течение 8-10 минут в термостате, периодически встряхивая на вортексе.

3. Вынуть пробирки из термостата и добавить в каждую 100 мкл осаждающего раствора (**реагент №2**).

4. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе. Инкубировать при комнатной температуре 2 минуты.

5. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин 3 минуты.

6. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать необходимое количество новых 1,5мл микроцентрифужных пробирок. Внести в каждую по 850 мкл осаждающего буфера (**реагент №3**).

7. Аккуратно, стараясь не задеть осадок, перенести 500-550 мкл супернатанта в подготовленные пробирки. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе. Инкубировать 30-60 секунд при комнатной температуре.

8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 3-х минут.

6.2 Адсорбция НК

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать новые микроцентрифужные пробирки 1,5 мл, и внести в каждую по 50 мкл сорбирующего раствора (**реагент №4**).

2. Отобрать супернатант после центрифугирования, не задевая осадок, и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки. Интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе.

3. Инкубировать при 70°C в течение 2-х минут в термостате встряхивая каждые 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе.

4. Вынуть пробирки из термостата и инкубировать 3 минуты при комнатной температуре, встряхивая каждые 30 секунд на микроцентрифуге-встряхивателе.

5. Центрифугировать пробирки 5000 об/мин 1 минуту.
6. Аккуратно удалить супернатант с помощью вакуумного отсасывателя, дозатора или при помощи пипетки Пастера, **не затрагивая сорбент!**.

6.3 Промывка НК

1. Добавить к сорбенту 800 мкл промывочного раствора 1 (**реагент №5**) 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 №6**) 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. Повторить пункты с 1 по 7 этапа **Промывка НК** еще один раз.

9. Установить пробирки с открытыми крышками в термостат. Инкубировать 5-7 минут при 70°C до полного испарения промывочного раствора.

10. 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 100 мкл элюирующего буфера (**реагент №7**) в пробирки с высушенным сорбентом.

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

4. Инкубировать при 70°C в течение 7-10 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 80 мкл в новые 1,5 мл пробирки, не задевая осадок кремниевых частиц.

Примечание: в случае забора кремниевых частиц рекомендуем повторить пункты 7-9 этапа **Элюция НК**. Наличие сорбента в элюате уменьшает качество и срок хранения раствора НК, а также ингибирует биохимические реакции (ПЦР, рестрикция и пр.)

Полученные НК пригодны для дальнейших манипуляций (ПЦР-диагностика и пр.). Перед использованием рекомендуем повторно центрифугировать элюат. 😊

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.

6.6 Возможные трудности при использовании выделенных образцов НК



Ингибирование ПЦР	Убедитесь, что не превышаете указанное количество образца. Убедитесь, что используете прописанное количество элюирующего буфера, занижение количества с целью повышения концентрации НК может привести к ингибированию ПЦР/ПЦР-РВ. Убедитесь, что используете в реакции ПЦР/ПЦР-РВ указанное производителем количество раствора НК. Убедитесь, что на последнем этапе, чистый элюат был перенесен в новую пробирку без захвата кремниевых частиц. Перед внесением образца в реакцию, рекомендуем провести дополнительное центрифугирование. Цвет элюата может быть слабокоричневым из-за окисленных и полифенольных комплексов НК в случае работы с гнилыми образцами.
Низкая чистота образцов по A260/A230	В связи с использованием реагентов хаотропной и неионной природы, которые имеют максимум поглощения 210-240 нм, полученный раствор будет иметь показатель A260/A230 в диапазоне 0,1-0,2. Рекомендуем не учитывать данный показатель. Чистота образцов по отношению A260/A280 при выделении набором «МетаГен/MetaGen» имеет показатель 1,8-2,2.

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1 Условия хранения

Набор реагентов «МетаГен/MetaGen» хранить при температуре от плюс 18 до плюс 25 °C в сухом защищенном от света месте.

7.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «МетаГен/MetaGen» 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 «МетаГен/MetaGen» 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.