

**Набор реагентов для выделения ДНК
фитоплазм из растительного материала
«ЦитоСорб/CytoSorb»**

ИНСТРУКЦИЯ по применению

1 НАЗНАЧЕНИЕ



Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» входит в новую линейку продуктов EasyWay производства компании «СИНТОЛ». Наборы EasyWay разработаны на основе достижений десятков исследователей по всему миру и усовершенствованы для выделения ДНК/РНК из сложных компонентов природной среды, а также для различных манипуляций с нуклеиновыми кислотами (НК).

1.1 Полное название

Набор реагентов для выделения ДНК фитоплазм из растительного материала «ЦитоСорб/CytoSorb».

1.2 Назначение

Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» предназначен для выделения внутриклеточной ДНК различных видов фитоплазм из растительного материала. Набор может быть также использован для выделения межклеточных (капиллярных) НК из растительного материала – вирусов, вириодов, бактериальных инфекций растений и др. Пригоден для работы со сложными для выделения растительными образцами (виноград, земляника и др.) с большим количеством ингибиторов (полифенолов, полисахаридов и др.). Для гомогенизации (предварительной подготовки образца перед выделением НК) подходят все части растения – лист, корень, стебель и т.д. Выделение образца занимает 60 минут без учета этапа пробоподготовки.



Набор НЕ предназначен для получения ДНК ядерного/полного генома растений!

1.3 Область применения

Область применения набора – лабораторная диагностика фитопатогенов, научные исследования. Набор может быть использован в лабораторных центрах и институтах, проводящих контроль карантинного фитосанитарного состояния растений, в том числе посадочного материала, в целях обнаружения РНК/ДНК фитопатогенов.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

Компоненты набора являются одноразовыми.

Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» не требует технического обслуживания и калибровки.

2.1 Состав набора

2.1.1 Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb»

Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» рассчитан на 50 выделений при ручной гомогенизации.

№	Реагент/ вспомогательный материал	Описание	Объем, мл	Количество, шт
1	Экстрагирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	160	2
2	Лизирующий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	10	1
3	Осаждающий буфер	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	60	1
4	Сорбирующий раствор	Суспензия с осадком белого цвета	3	2
5	Осаждающий раствор	Прозрачная бесцветная жидкость	30	1
6	Промывочный раствор 1	Прозрачная бесцветная жидкость	80	1
7	Промывочный раствор 2	Прозрачная бесцветная жидкость	50	1
8	Элюирующий буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	7	1
9	Микроцентрифужные пробирки 2 мл			50

2.2 Ограничения

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

При некачественной или недостаточно эффективной предварительной подготовке биологического 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 осаждающий и промывочный растворы (реагенты 5, 7) содержат легко воспламеняющиеся жидкости. Все работы с легко воспламеняющимися 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 растительного материала; 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 растительного материала;
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).

Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

Микроцентрифуга-вортекс (например, «Циклотемп-901»)

Автоматическая гомогенизация

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

Пробирки с шариками для гомогенизации

4.3.2 Для выделения ДНК/РНК

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 растительный материал, предназначенный для анализа фитопатогенов.

Рекомендованные количества образца¹

Целевой объект	Количество образца для выделения НК, мг		Количество водного гомогенного образца для выделения НК, мкл
	Гомогенизация с использованием гомогенизатора	Ручная гомогенизация	
Фитоплазменная инфекция	200-250	400-750	200
Бактериальная инфекция			
Грибная инфекция			
Вирусная/виroidная инфекция	20-100	60-200	

¹ – в случае выделения из сухих частей растения, количество образца для выделения необходимо уменьшить в 4 раза

Перед процедурой экстракции НК с помощью набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» исследуемые образцы должны пройти предварительную обработку (гомогенизацию) в соответствии с утвержденными протоколами пробоподготовки ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов, или с помощью специальных реагентов, входящих в коммерческие наборы и предназначенных для обработки растительных образцов для анализа фитопатогенов молекулярно-генетическими методами, согласно рекомендациям производителя.

5.1 Предварительная подготовка биологического материала

5.1.1 Ручная гомогенизация без применения жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный материал (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») при помощи стерильного одноразового пинцета в стерильную ступку.
2. Добавить в стерильную ступку 1 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**).
3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в стерильной ступке с пестиком, до получения однородной массы
4. Добавить еще 2 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**) в ступку с гомогенным образцом и повторно растереть образцы.
5. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
6. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе
7. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

5.1.2 Ручная гомогенизация с применением жидкого азота

1. Переместить исследуемый растительный 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. Инкубировать 10 сек.

3. Гомогенизировать необходимое количество растительного образца в ступке с пестиком. Необходимо максимально измельчить навески до состояния «пыли».
4. Убедиться, что ступка комнатной температуры, в случае если ступка холодная, перед добавлением экстрагирующего буфера подождать 2 минуты.
5. Добавить 3 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**) в ступку с исследуемым образцом и повторно растереть образцы до гомогенного состояния.
6. Перенести 1 мл гомогенного образца из ступки в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.
7. Инкубировать 10 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе
8. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

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

5.1.3 Пробоподготовка при выделении НК из водных гомогенных образцов

1. Добавить в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки 500 мкл экстрагирующего буфера (**реагент №1**)
2. В пробирки с экстрагирующим буфером добавить 200мкл образца
3. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе. Перейти к пункту 2 этапа **Лизис**.

5.1.4 Автоматическая гомогенизация

1. Поместить исследуемый растительный образец (см. таблицу «Рекомендованные количества образца») в пробирку с шариками для гомогенизации при помощи стерильного одноразового пинцета.
2. Добавить в пробирку с шариками для гомогенизации с образцом 1 мл экстрагирующего буфера (**реагент №1**)
3. Установить подготовленные пробирки в ротор гомогенизатора Precellys Evolution Bertin Technologies (или аналогичного). Запустить программу гомогенизации: **10000rpm/15sec pause 30sec 4 повтора**.
4. Инкубировать 5 минут при комнатной температуре периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе
5. Центрифугировать 5000 об/мин 5 минут.

Примечание: проверьте эффективность гомогенизации образца – не должно присутствовать больших цельных частей растения. В случае не достаточной гомогенизации необходимо повторить пункт 2 этапа **Пробоподготовка Автоматическая гомогенизация**

5.2 Условия транспортирования и возможного хранения анализируемых проб

Транспортировку и хранение образцов для анализа проводят в соответствии с утвержденными протоколами ЕРРО, стандартами ВНИИКР и ГОСТами при выявлении и идентификации фитопатогенов.

6 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Перед выделением следует убедиться в отсутствии осадка в реагентах 1, 2, 3. В случае наличия осадка необходимо нагреть раствор до 30-60 °С до полного растворения осадка.

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

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать новые 1,5 мл пробирки.
2. Добавить 150мкл лизирующего раствора (**реагент №2**) в каждую пробирку.
3. Отобрать 500 мкл супернатанта после центрифугирования образцов и перенести в подготовленные 1,5 мл пробирки, содержащие лизирующий раствор.

Примечание: в случае, если объем супернатанта меньше чем 500 мкл, объём образца может быть уменьшен до 300 мкл.

4. Интенсивно перемешать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе и инкубировать при 65°С 5 минут в термостате, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата и охладить пробирки при комнатной температуре. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин 5 минут.

6.2. Сорбция и осаждение НК

1. Во время центрифугирования подготовить и промаркировать чистые пробирки объемом 2 мл (**вспомогательный материал № 9**), и внести в каждую по 950 мкл осаждающего буфера (**реагент №3**).

2. Не задевая осадок, отобрать 500 мкл супернатанта после центрифугирования и перенести в подготовленные 2 мл пробирки.

3. Добавить по 50 мкл сорбирующего раствора (**реагент № 4**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе.

4. Инкубировать при 65°С 5 минут в термостате, встряхивая пробирки переворачиванием каждую минуту.

5. Вынуть пробирки из термостата. Кратковременно центрифугировать пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе.

6. Добавить в каждую пробирку 500 мкл осаждающего раствора (**реагент №5**).

7. Инкубировать при комнатной температуре 5 минут, встряхивая пробирки переворачиванием каждую минуту.

8. Центрифугировать пробирки 1 минуту при 4000 об/мин.

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

6.3. Промывка НК

1. Добавить к сорбенту 800 мкл промывочного раствора 1 (**реагент № 6**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата кремниевых частиц.

Примечание: В связи с наличием сложных растительных образцов с высоким количеством полифенолов и полисахаридов, кремниевые частицы могут изменять свою окраску на зеленый или красный цвет, который смывается 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 1 минуту при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

3. Центрифугировать минуту при 4000 об/мин.

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

5. Добавить 500 мкл промывочного раствора 2 (**реагент №7**) и интенсивно перемешать на микроцентрифуге-встряхивателе до полного разрушения конгломерата кремниевых частиц.

6. Инкубировать 30 секунд при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

7. Центрифугировать 1 минуту при 4000 об/мин.

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

9. Повторить пункты с 1-8 этапа **Промывка НК** еще один раз.

10. Установить пробирки с открытыми крышками в термостат. Инкубировать 5-10 минут при 65°C до полного испарения промывочного раствора.

11. Через 5 минут начать проверку пробирок с сорбентом на степень высушивания. Для этого каждую пробирку закрывают и вынимают 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.

6.4. Элюция НК

1. Вынуть пробирки с полностью высохшим сорбентом из термостата.

2. Добавить 100 мкл элюирующего буфера (**реагент № 8**) в пробирки с высушенным сорбентом.

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

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

5. Вынуть пробирки из термостата.

6. Центрифугировать 3 минуты при 13000 об/мин.

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

8. Перенести 80 мкл супернатанта в чистые 1,5 мл пробирки в соответствии с маркировкой, не задевая сорбент.

Примечание: в случае забора сорбента рекомендуется повторить пункты 7-9 этапа **Элюция НК**. Наличие сорбента в чистом растворе ДНК/РНК уменьшает качество и срок хранения раствора, 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.

Раствор РНК может храниться при температуре не выше минус 18°C в течение 6 месяцев, и в течение года при температуре минус 78°C.

6.6. Возможные трудности при использовании выделенных образцов НК



Ингибирование ПЦР	<p>Убедитесь, что не превышаете указанное количество образца.</p> <p>Убедитесь, что используете прописанное количество элюирующего буфера, занижение количества с целью повышения концентрации ДНК/РНК может привести к ингибированию ПЦР.</p> <p>Убедитесь, что используете в реакции ПЦР указанное производителем количество раствора ДНК/РНК.</p> <p>Убедитесь, что на последнем этапе, чистый раствор ДНК/РНК был перенесен в чистую пробирку без захвата сорбента. Перед внесением образца в реакцию, рекомендуем провести дополнительное центрифугирование.</p>
Низкая чистота образцов по A260/A230	<p>В связи с использованием реагентов по типу хаотропов и неионных ПАВ, которые имеют максимум поглощения 210-240 нм, полученный раствор будет иметь показатель 0,1-0,2 по данному соотношению. Рекомендуем не учитывать данный показатель. Чистота образцов по отношению A260/A280 при выделении набором «ЦитоСорб/CytoSorb» имеет показатель 1,8-2,2.</p>

7 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

7.1 Условия хранения

Набор реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» хранить при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С в сухом защищенном от света месте.

7.2 Условия транспортирования

Транспортирование набора реагентов «ЦитоСорб/CytoSorb» должно производиться крытым транспортом (автомобильным, железнодорожным либо воздушным) при температуре от плюс 18 до плюс 25 °С.

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^к 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 «ЦитоСорб/CytoSorb» 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.