



Протокол проведения функционального теста средств для деконтаминации от РНКаз

Общие замечания:

При выполнении работ следует помнить, что даже в случае контролируемой контаминации существует риск распространения контаминации из-за неправильных действий оператора. Рекомендуем полностью ознакомиться с протоколом перед началом работ и спланировать передвижение между рабочими зонами и смену одежды и перчаток. Рекомендуем использовать средства RNaseClean Soft и RNaseClean Xtreme для предотвращения распространения контаминации.

Работа с РНК проводится в соответствии с принятым в лаборатории протоколом работы с РНК, а именно в ламинарном боксе с использованием пластика, свободного от РНКаз и ДНКаз, и в отдельном комплекте одежды, предназначенной для работы с РНК.

Необходимые реагенты, материалы и оборудование:

- Поверхность для проведения смывов (нержавеющая сталь)
- Пробирки 1.5 мл
- Пробирки 0.2 мл
- Пул РНК из культуры клеток млекопитающих в концентрации ~170-200 нг/мкл
- РНКаза А 0.1 мг/мл
- РНКаза А 0.01 мг/мл
- Вода, свободная от РНКаз и ДНКаз
- Наконечники 1-10 мкл с фильтром
- Наконечники 10-100 мкл с фильтром
- Наконечники 100-1000 мкл с фильтром
- Дозатор 1-10 мкл
- Дозатор 10-100 мкл
- Дозатор 100-1000 мкл
- Средства для деконтаминации от РНКаз



- Оборудование и реагенты для проведения электрофореза в агарозном геле:
 - агароза
 - ТАЕ-буфер
 - бромистый этидий
 - камера для электрофореза

Протокол работы

1. Подготовить поверхность для проведения смывов:
 - на нержавеющей поверхности расчертить простым карандашом квадраты со стороной 1.5 см;
 - притереть поверхность квадратов влажными ватными зондами или ватными палочками так, чтобы при растирании по поверхности жидкость не собиралась в капли и жидкость высыхала равномерно по поверхности.
2. Подготовить 2+n пробирок объемом 1.5 мл для проведения смывов с поверхностей, где n - количество исследуемых образцов контаминации/деконтаминации.
3. В каждую из пробирок из п. 2 добавить 200 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз.
4. Подписать пробирки из п. 3: 1 - NC2w - для смыва с неконтаминированной поверхности (один из отрицательных контролей эксперимента); 2 - PC2w - для смыва с загрязненной поверхности (один из положительных контролей эксперимента); pw - для смывов после обработки контаминированной поверхности тестируемым средством для деконтаминации, где n - код образца.
5. Провести смыв с незагрязненной поверхности:
 - перенести наконечником воду из пробирки NC2w на один из квадратов на поверхности для проведения смывов;
 - перемешать пипетированием воду на поверхности;
 - вернуть воду с поверхности в ту же пробирку.



6. Провести контролируемую контаминацию 1+n квадратов на поверхности для проведения смывов:
 - 100 мкл раствора РНКазы А в концентрации 0.1 мг/мл поместить в центр квадрата;
 - распределить по всей поверхности квадрата;
 - дождаться полного высыхания.
7. Провести смыв с контаминированной поверхности:
 - перенести наконечником воду из пробирки РС2w на один из контаминированных квадратов на поверхности для проведения смывов;
 - перемешать пипетированием воду на поверхности;
 - вернуть воду с поверхности в пробирку РС2w;
 - пометить использованную зону и не работать с ней до деконтаминации по окончании работ.
8. Провести деконтаминационную обработку тестируемым средством согласно инструкции.
9. Провести опытные смывы с деконтаминированной поверхности:
 - перенести наконечником воду из каждой пробирки пw на один из неиспользованных контаминированных квадратов на поверхности для проведения смывов;
 - перемешать пипетированием воду на поверхности;
 - вернуть воду с каждой поверхности в соответствующую пробирку.
10. Подготовить 4+n пробирок объемом 0.2 мл для проведения пролонгированного функционального теста - здесь и далее это пробирки для инкубации.
11. Добавить в пробирки для инкубации по 5 мкл пула РНК.
12. Подписать пробирки для инкубации следующим образом:
 - 1) NC1 - отрицательный контроль - проверка используемой воды;
 - 2) NC2 - отрицательный контроль - проверка качества проведения смыва;
 - 3) PC1 - положительный контроль - проверка активности РНКазы А;



- 4) PC2 - положительный контроль - проверка качества проведения смыва;
 - 5) Оставшиеся пробирки подписать в соответствии с кодами образцов.
13. В пробирку NC1 добавить 15 мкл воды, свободной от РНКаз и ДНКаз.
 14. В пробирку NC2 добавить 15 мкл смыва из пробирки NC2w.
 15. В пробирку PC1 добавить 15 мкл раствора РНКазы А в концентрации 0.01 мг/мл.
 16. В пробирку PC2 добавить 15 мкл смыва из пробирки PC2w.
 17. В пробирки для образцов добавить по 15 мкл соответствующих смывов из пробирок nw, где n - код образца.
 18. Инкубировать 1 час при комнатной температуре.
 19. Деконтаминировать зоны искусственной контаминации соответствующими спецсредствами.
 20. По окончании инкубации в п. 18 смешать по 5 мкл каждого образца из пробирок для инкубации с 5 мкл формамида и провести электрофорез в 1.4% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. В отрицательном контроле должно наблюдаться наличие шмера мРНК 5 кб-0.5 кб, целостных бэндов 18S и 28S рРНК и, при наличии, целостных бэндов 12S и 16S рРНК и тРНК. Деградационное облако должно отсутствовать. В положительном контроле должен наблюдаться деградационный шмер или деградационное облако, целостные бэнды рРНК и тРНК наблюдаться не должны. Сохранение паттерна РНК, соответствующего отрицательному контрольному, в опытных образцах свидетельствует о срабатывании реагента для деконтаминации от РНКаз.
 21. При необходимости и при успешном прохождении контролей п. 20 тест можно повторить через 24 часа и 48 часов.