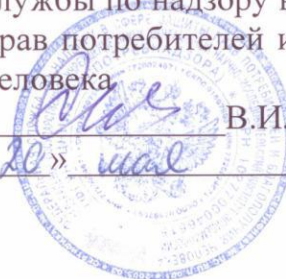


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 15.09.2008 № 7419-Пр/08

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального
государственного учреждения
науки «Центральный научно-
исследовательский институт
эпидемиологии» Федеральной
службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия
человека


В.И.Покровский
«20» сентяб 2008 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов
для электрофоретической детекции продуктов
амплификации в агарозном геле

«ЭФ»

ФОРМА КОМПЛЕКТАЦИИ.

Комплект реагентов выпускается в 4 формах комплектации:

Форма 1 включает комплект реагентов «ЭФ» вариант 200.

Форма 2 включает комплект реагентов «ЭФ» вариант 300.

Форма 3 включает комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип-200.

Форма 4 включает комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип-300.

СОСТАВ.

Комплект реагентов «ЭФ» вариант 200 или вариант 300 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

Реактив	Описание	Вариант 200		Вариант 300	
		Объём (мл) Масса (г)	Кол-во	Объём (мл) Масса (г)	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон	75 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК	Порошок белого цвета	1,7 г	2 флакона	1,7 г	3 флакона

Комплект реагентов вариант 200 рассчитан на 240 тестов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

Комплект реагентов вариант 300 рассчитан на 360 тестов (из расчета 100 мл геля – 5 рядов по 24 лунки).

Комплект реагентов «ЭФ» вариант генотип-200 или вариант генотип-300 – комплект реагентов для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле **включает:**

Реактив	Описание	Вариант генотип-200		Вариант генотип-300	
		Объём (мл) Масса (г)	Кол-во	Объём (мл) Масса (г)	Кол-во
Трис-боратный буфер (ТБЕ) концентрированный с бромидом этидия	Прозрачная жидкость оранжевого цвета	50 мл	1 флакон	75 мл	1 флакон
Агароза для электрофореза ДНК с высоким разрешением	Порошок белого цвета	3,0 г	2 флакона	3,0 г	3 флакона

Комплект реагентов вариант генотип-200 рассчитан на 144 теста (из расчета 100 мл геля – 3 ряда по 24 лунки).

Комплект реагентов вариант генотип-300 рассчитан на 216 тестов (из расчета 100 мл геля – 3 ряда по 24 лунки).

НАЗНАЧЕНИЕ.

Комплект реагентов «ЭФ» предназначен для электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле.

Вариант генотип-200 (форма 3) и вариант генотип-300 (форма 4) предназначены для разделения продуктов ПЦР в формате «мультиплекс», когда специфическими продуктами амплификации являются несколько фрагментов ДНК разной длины.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

Необходимо строго соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы здравоохранения СССР», Москва, 1981 г.

Необходимо соблюдать методические рекомендации по проведению работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции. Государственный комитет санитарно-эпидемиологического надзора РФ. Москва, 1995 г.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ, ТРЕБУЕМЫЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПРОДУКТОВ ПЦР-АМПЛИФИКАЦИИ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ.

(с указанием фирм-производителей/поставщиков):

1. Камера для горизонтального электрофореза объёмом не более 400 мл (например, «SE-2», «Хеликон», Россия).
2. Источник постоянного тока с напряжением 150 – 460 В (например, «Эльф-4», «ДНК-Технология», Россия).
3. Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей (например, «Биоком», Россия).
4. Видеосистема с цифровой камерой для регистрации

Форма 1: **REF** K5-200, **REF** K12-0701-200; Форма 2: **REF** K5-300, **REF** K12-0702-300; Форма 3: **REF** K6-200,

REF K12-0703-200 / **VER** 20.05.08 / стр. 3 из 8

результатов и передачи изображения (например, «Биотест-1», «ЦНИИ Эпидемиологии», Россия; «BioRad», США).

5. Аквадистиллятор.
6. Холодильник от 2 до 8 °С.
7. Микроволновая печь для плавления агарозы.
8. Колба коническая из термостойкого стекла (ГОСТ 21400-75) для плавления агарозы на 250 мл.
9. Мерный цилиндр на 1 л (ГОСТ 1770-74).
10. Штатив для микропробирок на 0,5 мл (например, «ИнтерЛабСервис», Россия).
11. Отдельный механический или электронный дозатор объемом 10-40 мкл (например, «Ленпипет», Россия).
12. Одноразовые наконечники до 200 мкл в штативе (например, «Ахуген», США).
13. Пластиковая ёмкость на 5 л для дезактивации буфера и гелей, содержащих бромид этидия.
14. Отдельный халат и одноразовые перчатки.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА.

ВНИМАНИЕ! Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в других зонах ПЦР-лаборатории.

Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить **25 мл трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия**, довести дистиллированной водой до **500 мл**, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать.

ВНИМАНИЕ! Этидия бромид – канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой.

Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. раздел «Обеззараживание»).

2. **Агарозу** из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить **100 мл** рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой – 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до температуры 65-70 °С.
3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры для горизонтального электрофореза. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее **3 см** (форма 1 или 2) или **5 см** (форма 3 или 4) друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.
4. После полного застывания геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру для горизонтального электрофореза, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду (ДНК будет двигаться к положительному). Залить в камеру для горизонтального электрофореза готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Порядок работы.

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать из-под слоя масла по **10–15 мкл проб** и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В **каждом** ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен **K+** и, желательнее, маркер молекулярных масс ДНК (с комплектом не поставляется).

2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры «SE-2» («Хеликон») и источника питания «Эльф-4» («ДНК-Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза – 18-20 мин (форма 1 или 2), 40 мин (форма 3 или 4). Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.
3. По завершении времени электрофореза (краситель ксиленцианол при этом пройдет примерно половину длины геля – 1,5 см (форма 1 или 2), 2,5 см (форма 3 или 4); краситель крезоловый красный – примерно 2/3 длины геля – 2 см (форма 1 или 2), 3,5 см (форма 3 или 4)), выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены маской или стеклянной пластиной!

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ.

Первый способ.

Необходимые реагенты для обработки 1 литра буфера и гелей:

1. 0,5 М перманганат калия – 1 л,
2. 2,5 М соляная кислота – 1 л,
3. 2,5 М NaOH – 1 л.

Порядок работы:

Отработанные гели и буфер из камеры помещают в пластиковую емкость на 5 л с плотно завинчивающейся крышкой. Добавляют 1 объем 0,5 М раствора калия перманганата и затем 1 объем 2,5 М соляной кислоты. Аккуратно перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 4-6 ч. Добавляют 1 объем 2,5 М натрия гидроксида, аккуратно перемешивают. Сбрасывают нейтрализованные реактивы в канализацию.

Второй способ.

Необходимые реагенты:

1. Стеклянная колонка емкостью на 1–2 л.
2. Активированный уголь.

Порядок работы:

Заполнить колонку активированным углем и пропускать отработанный буфер через нее небольшими порциями. Дезактивированный раствор можно сливать в канализацию. Гели дезактивировать первым способом.

ВНИМАНИЕ! При хранении трис-боратного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия возможно выпадение осадка соли борной кислоты, не влияющее на качество реактива.

Если в концентрированном буфере имеется осадок, то готовят рабочий раствор (согласно инструкции к комплекту реагентов), который затем прогревают при помешивании каждые 10-15 мин в кипящей водяной бане в течение 30 мин до растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! Не допускать попадания нерастворенных частиц борной кислоты в агарозный гель!

СРОК ГОДНОСТИ, УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ И ХРАНЕНИЯ

Срок годности. 9 мес. Комплект реагентов с истекшим сроком годности применению не подлежит.

Транспортирование. Комплект реагентов транспортировать при температуре от 2 до 25 °С.

Хранение. Комплект реагентов хранить при температуре от 18 до 25 °С в защищенном от света месте.

Условия отпуска. Для лечебно-профилактических и санитарно-профилактических учреждений.

Рекламации на качество комплекта реагентов «ЭФ» направлять в адрес ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора (119002, г. Москва, пер. Сивцев Вражек, д. 41, тел. (495) 241-39-22, факс (495) 241-92-38), в адрес предприятия-изготовителя ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а, тел. (495) 305-54-24, факс (495) 305-54-23, e-mail: obtk@pcr.ru) и в адрес официального дилера – компанию ООО «ИнтерЛабСервис»

(тел. (495) 105-05-54, факс (495) 916-18-18, e-mail: products@pcr.ru).

Директор ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора



 В.И. Покровский

Руководитель Государственных испытаний
Зав. лабораторией вирусных кишечных инфекций
и молекулярной биологии
ФГУН ГИСК им. Тарасевича Роспотребнадзора



Г.М.Игнатъев