



Микро-ОТ

**набор реагентов для проведения
обратной транскрипции микроРНК**

Инструкция по применению

вер. май 2019 г.

1. НАЗНАЧЕНИЕ

МикроРНК представляют собой небольшие некодирующие белок молекулы РНК, которые регулируют порядка 30% всех кодирующих белки генов. МикроРНК вовлечены в процессы развития, дифференцировки, апоптоза, жирового обмена и онкогенеза. Из-за их небольшого размера (около 22 п.о.) микроРНК не могут быть проанализированы традиционными методами ПЦР.

Набор реагентов предназначен для проведения обратной транскрипции микроРНК. Анализируемым материалом является микроРНК, выделенная из лейкоцитов, сыворотки или плазмы крови человека. В набор входят реактивы для проведения реакции обратной транскрипции, за исключением специфического к каждой микроРНК stem-loop праймера.

Набор реагентов может быть использован в научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1 Принцип метода

Метод обратной транскрипции микроРНК основан на обратной транскрипции с использованием петлевого праймера (stem-loop), что значительно улучшает специфичность реакции.

2.2. Состав набора и форма выпуска

Набор рассчитан на проведение 50 тестов.

Все компоненты набора готовы к использованию, в составе набора отсутствуют лиофилизированные компоненты.

В состав набора входит:

Название	Описание	Объем, мкл	Кол-во (шт)
OT-буфер 5X	Прозрачная жидкость	260	1
dNTP	Прозрачная жидкость	55	1
MMLV	Прозрачная жидкость	55	1
Разбавитель	Прозрачная жидкость	500	1
Инструкция по применению	-	-	1 штука
Паспорт	-	-	1 штука

3. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Набор не содержит веществ и материалов, требующих обеспечения специальных мер безопасности, и не представляет опасности для людей в течение всего срока годности.
2. Все компоненты набора нетоксичны для человека в

используемых концентрациях. При попадании на кожу или слизистые оболочки компонентов набора место контакта необходимо промыть большим количеством воды.

3. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 6 июня 2012 г. № 4н).
4. При использовании набора необходимо пользоваться одноразовыми перчатками, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для автоматических пипеток с аэрозольным барьером.
5. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания медицинских отходов.
6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при добавлении разных образцов.
7. Анализ проводится в один этап в одном помещении.
8. Все лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должны быть строго стационарными. Запрещается их перенос из одного помещения в другое.
9. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала

и после начала работ облучаться ультрафиолетовым светом.

10. Все использованные одноразовые материалы подвергать обработке дезинфицирующими средствами с последующей утилизацией.
11. Ключевой мерой предосторожности при работе с набором является соблюдение требований, изложенных в ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности», утвержденном Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 декабря 2007 г.

4. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Амплификатор детектирующий.
2. Микроцентрифуга типа «Вортекс».
3. Одноразовые наконечники для пипеток переменного объема с аэрозольным барьером до 10 мкл, 100 мкл и 1000 мкл.
4. Стерильный ламинарный шкаф.
5. Холодильник с морозильной камерой от -24 до -16°C.
6. Одноразовые полипропиленовые завинчивающиеся или плотно закрывающиеся микропробирки объемом 1,5 мл.
7. Отдельный халат и одноразовые резиновые перчатки.
8. Стерильные микропробирки для ПЦР объемом 0,1 - 0,2 мкл.

9. Автоматические пипетки переменного объема.

5. МАТЕРИАЛ ДЛЯ АНАЛИЗА

В качестве образца необходимо использовать микроРНК, выделенную из периферической крови, плазмы, сыворотки крови или костного мозга человека. Не допускается использование выделенной микроРНК из цельной крови с гепарином в качестве антикоагулянта.

6. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Транспортирование набора необходимо производить с хладоэлементами не допуская длительного (более 12 час размораживания). Необходимо избегать многократного (более 20 циклов) замораживания-размораживания. Транспортировка набора реагентов может производиться в термоконтейнерах с соблюдением необходимых температурных режимов всеми видами крытого транспорта в соответствии с правилами, установленными на данном виде транспорта.

Транспортировка и хранение должны осуществляться в упаковке предприятия-изготовителя в сухом, защищенном от света месте в течение всего срока годности с соблюдением необходимых температурных режимов.

Набор реагентов, транспортировавшийся или хранившийся с

нарушением температурного режима, применению не подлежит.

7. СРОК ГОДНОСТИ

Срок годности набора составляет 12 месяцев с даты производства при соблюдении условий транспортировки и хранения. Нельзя использовать набор после установленной даты окончания срока годности. Срок годности и условия хранения вскрытых реагентов соответствуют сроку годности и условиям хранения, указанным на этикетке для невскрытых реагентов.

8. ТРЕБОВАНИЯ К ПЕРСОНАЛУ

Набор предназначен для профессионального применения и должен использоваться обученным персоналом.

9. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

9.1 Подготовка реагентов

Все компоненты набора готовы к использованию.

9.2 Проведение обратной транскрипции (ОТ)

9.2.1 Довести компоненты набора до комнатной температуры: ОТ-буфер 5X, dNTP, праймер stem-loop, разбавитель. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок. **Ревертазу не размораживать!!!**

- 9.2.2 Разморозить пробы микроРНК.
- 9.2.3 Приготовить реакционную смесь из расчета на 1 пробу согласно таблице 1. Тщательно перемешать на вортексе. Центрифугировать 5 сек при 5 тыс об/мин на микроцентрифуге для сброса капель с крышек пробирок.

Таблица 1. Расчет необходимого количества ПЦР-смесей для анализа N-проб

Наименование	Объем, мкл на 1 пробу	Объем, мкл на N проб
OT-буфер 5X	5	5*N
dNTP	1	1*N
Праймер stem-loop	3	3*N
Разбавитель	5	5*N
Ревертаза	1	1*N

Ревертазу необходимо использовать непосредственно из морозильной камеры. После добавления в реакционную смесь немедленно убирать в морозильную камеру. Не размораживать!!!

- 9.2.4 Отобрать необходимое количество микропробирок на 0,2 или 0,5 мл.
- 9.2.5 Внести в каждую микропробирку по 15 мкл реакционной смеси.
- 9.2.6 Внести в пробирки с реакционной смесью по 10 мкл микроРНК, используя наконечники с аэрозольным барьером. Пробирки кратковременно перемешать на вортексе, сбросить капли.
- 9.2.7 Поместить пробирки в амплификатор. Установить программу (см. таблицу 2).

Таблица 2. Протокол ОТ

Этап	Повторов	Время	Температура
1	1	30 мин	16°C
2	1	30 мин	42°C
3	1	5 мин	92°C
4	Хранение		4°C

9.2.8 По окончании программы ОТ пробы кДНК хранить при -20°C до постановки ПЦР.

10. УТИЛИЗАЦИЯ (УНИЧТОЖЕНИЕ) И ДЕЗИНФЕКЦИЯ

При работе с исследуемыми образцами и отходами следует соблюдать меры предосторожности, принятые при работе с потенциально инфекционным материалом.

Основные правила работы изложены в «Инструкции по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17 января 1991 г. и методических указаниях МУ-287-113 («Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения», утвержденных департаментом госсанэпиднадзора Минздрава РФ от 30.12.1998 г.). Нормы контроля, дезинфекции и утилизации изложены в Постановлении Главного государственного санитарного врача

РФ от 9 декабря 2010 г. №163 «Об утверждении СанПиН 2.1.7.2790-10 „Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами“».

Дезинфекцию, а также утилизацию или уничтожение наборов реагентов и отходов следует проводить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

Возможные типы отходов:

- все компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности набора реагентов, и упаковочная тара (класс А);
- использованные в ходе работы набора реагентов компоненты (класс Б);
- выделенная микроРНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований или архивного хранения (класс Б).

Компоненты набора реагентов, оставшиеся неиспользованными по истечении срока годности, имеют класс опасности А на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими

отходами».

Сбор отходов класса А осуществляется в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного. Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров. Емкости для сбора отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А". Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты доставляются с использованием средств малой механизации и перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора отходов данного класса, установленные на специальной площадке (помещении).

Компоненты, использованные в ходе работы набора реагентов, и выделенная ДНК в элюирующем растворе, не используемая для дальнейших исследований и архивного хранения, имеют класс опасности Б на основании СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

Отходы класса Б подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Выбор метода обеззараживания/обезвреживания определяется возможностями организации, осуществляющей медицинскую и/или фармацевтическую деятельность, и выполняется при

разработке схемы обращения с медицинскими отходами.

Отходы класса Б собираются в одноразовую мягкую (пакеты) или твердую (непрокальваемую) упаковку (контейнеры) желтого цвета или имеющие желтую маркировку. Выбор упаковки зависит от морфологического состава отходов.

Для сбора органических, жидких отходов класса Б должны использоваться одноразовые непрокальваемые влагостойкие емкости с крышкой (контейнеры), обеспечивающей их герметизацию и исключающей возможность самопроизвольного вскрытия.

11. ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Не применимо.

12. ТЕКУЩИЙ РЕМОНТ

Не применимо.

13. ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям ТУ при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения.

По вопросам качества набора следует обращаться в ООО «Формула гена» по фактическому адресу: 660036, Россия, г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, строение 45, офис 102, тел. 290-55-13

ООО «Формула гена»

г. Красноярск, ул. Академгородок, д. 50, стр. 45, оф. 101

тел. +7(391)290-55-13

mail@formulagena.ru

formulagena.ru