

Декабрь 2014 г.

Руководство к набору QIAamp[®] *cador*[®] Pathogen Mini

Для выделения РНК и ДНК вирусов и ДНК бактерий из цельной крови, сыворотки крови, плазмы крови, других физиологических жидкостей, а также мазков, смывов и образцов тканей животного происхождения.



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

Компания QIAGEN — ведущий поставщик инновационных технологий отбора и анализа проб, позволяющих выделять и распознавать компоненты любых биологических образцов. Наши высокотехнологичные продукты и услуги отличаются высоким качеством и обеспечивают успех на всех этапах работы, от взятия образца до получения результата анализа.

QIAGEN задает стандарты в таких областях, как:

- ☉ Очистка ДНК, РНК и белков
- ☉ Анализ нуклеиновых кислот и белков
- ☉ Исследование микро-РНК и РНК-интерференции
- ☉ Автоматизация технологических процессов отбора и анализа проб

Наша миссия заключается в том, чтобы помочь вам добиваться выдающихся успехов и совершать прорывы. Более подробную информацию см. на веб-сайте www.qiagen.com.

Комплектация

Комплектация набора	4
Хранение	5
Назначение	5
Информация по технике безопасности	6
Контроль качества	6
Введение	7
Принцип действия и порядок работы	7
Описание протоколов	7
Протокол выделения нуклеиновых кислот	9
Методики предварительной обработки	10
Оборудование и реактивы, обеспечиваемые пользователем	13
Важные замечания	15
Исходный материал	15
Выход нуклеиновых кислот	17
Использование РНК-носителя и внутренних контролей	18
Хранение нуклеиновых кислот	19
Обращение с РНК	19
Подготовка реактивов	19
Протокол: Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей	22
Предварительная обработка В1 — для труднолизируемых бактерий в цельной крови или предварительно обработанных тканях	25
Предварительная обработка В2 — для труднолизируемых бактерий в бесклеточных жидкостях	27
Предварительная обработка В3 — для легколизируемых бактерий в больших объемах бесклеточных жидкостей	29
Предварительная обработка Т1 — механическое разрушение тканей	30
Предварительная обработка Т2 — ферментативное расщепление тканей	31
Предварительная обработка Т3 — быстрое частичное разрушение тканей	33
Предварительная обработка Т4 — органическая экстракция для тканей, плохо поддающихся обработке	35
Руководство по поиску и устранению неполадок	37
Литература	41
Информация для заказа	42

Комплектация набора

QIAamp <i>cador</i> Pathogen Mini Kit	(50)	(250)
№ по каталогу	54104	54106
Количество образцов для приготовления	50	250
QIAamp Mini Columns (колонки QIAamp Mini)	50	250
Collection Tubes (пробирки для взятия образцов) (2 л)	200	1000
Buffer VXL (буфер VXL)*	6 мл	30 мл
Buffer ACB (буфер ACB)*† (концентрат)	12 мл	60 мл
QIAGEN® Proteinase K (протеиназа K QIAGEN®)	1,25 мл	6 мл
Carrier RNA (poly A) (РНК-носитель (полиадениловая кислота))	310 мкг	310 мкг
Buffer AW1 (буфер AW1)*‡ (концентрат)	19 мл	98 мл
Buffer AW2 (буфер AW2)‡ (концентрат)	17 мл	81 мл
Buffer AVE (буфер AVE)§	20 мл	2 × 20 мл
Quick-Start Protocol (Краткая инструкция)	1	1

* Содержит хаотропную соль. Принимайте надлежащие меры безопасности при работе в лаборатории и работайте с реактивами в перчатках. Несовместимо с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливающий компонент. Информацию о безопасности см. на стр. 6.

† Перед первым использованием добавьте изопропиловый спирт, как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.

‡ Перед первым использованием добавьте этиловый спирт (96–100 %), как указано на флаконе, для получения рабочего раствора.

§ Содержит натрия азид в качестве консерванта.

Хранение

Колонки QIAamp Mini и буферы можно хранить в сухом месте при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности, указанного на упаковке набора, без ущерба для функциональных характеристик.

Лиофилизированную РНК-носитель можно хранить при комнатной температуре до истечения срока годности, указанного на упаковке набора. Для использования лиофилизированную РНК-носитель необходимо растворить в буфере AVE, а затем добавить к буферу VXL, как описано в разделе «Подготовка реактивов» на стр. 19.

Приготовленный таким образом свежий раствор РНК-носителя/буфера AVE/буфера VXL сохраняет стабильность в течение не более 48 часов при комнатной температуре. Неиспользованный раствор РНК-носителя в буфере AVE следует немедленно заморозить в аликвотах при температуре от –15 до –30°C. Не подвержайте аликвоты РНК-носителя заморозке и оттаиванию более 3 раз.

Протеиназу K QIAGEN можно хранить при комнатной температуре. При длительном хранении, а также если температура окружающего воздуха часто превышает 25°C, рекомендуется использовать температуру 2–8°C.

Назначение

Набор QIAamp cadof Pathogen Mini предназначен для извлечения нуклеиновых кислот патогенов (РНК и ДНК вирусов, ДНК бактерий) из цельной крови, сыворотки крови, плазмы крови, других физиологических жидкостей, а также мазков, смывов и образцов тканей животного происхождения.

Для лабораторного использования. Не предназначено для использования в рамках диагностических процедур в ветеринарии. Со стороны производителя не делается никаких заявлений с целью предоставления информации, связанной с диагностикой, профилактикой или лечением заболеваний у животных.

При обращении с продуктами следует тщательно соблюдать все надлежащие меры предосторожности. Всем пользователям продукции QIAGEN рекомендуется следовать директивам Национального института здравоохранения США (National Institute of Health, NIH), разработанным для опытов с рекомбинантной ДНК, и другим действующим методическим указаниям.

Информация по технике безопасности

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Дополнительную информацию см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ). Для каждого набора QIAGEN и каждого компонента набора их можно найти, просмотреть и распечатать в Интернете по адресу www.qiagen.com/safety, где они размещены в удобном и компактном формате PDF.



ВНИМАНИЕ! НЕ добавляйте отбеливающие вещества и кислые растворы непосредственно в отходы, образовавшиеся в результате приготовления образцов.

Буферы VXL и AW1 содержат гуанидингидрохлорид, а буфер ACB — гуанидинтиоцианат. В сочетании с отбеливающими агентами эти вещества могут образовывать высокоактивные соединения.

При проливании жидкости, содержащей эти буферы, вымойте загрязненную поверхность водным раствором подходящего лабораторного моющего средства. Если пролитая жидкость содержит потенциальные возбудители инфекции, вымойте загрязненный участок сначала водным раствором лабораторного моющего средства, а затем 1 % (объемное содержание) раствором гипохлорита натрия.

Контроль качества

В рамках сертифицированной по ISO системы управления качеством компании QIAGEN каждая партия наборов QIAamp *cador* Pathogen Mini проходит проверку на соответствие определенным параметрам в целях обеспечения стабильного качества продукции.

Введение

Набор QIAamp *cador* Pathogen Mini позволяет эффективно выделять РНК и ДНК вирусов, а также ДНК бактерий из широкого спектра типов образцов животного происхождения, в частности образцов цельной крови, сыворотки крови, плазмы крови, мазков, смывов, а также образцов тканей (см. раздел «Исходные материалы» на стр. 15). Выделяемые нуклеиновые кислоты свободны от белков, нуклеаз и других примесей и готовы к использованию на последующих этапах работы, например для определения патогена методом ПЦР в реальном времени.

Набор не предназначен для приготовления препаратов РНК или ДНК хозяина.

Принцип действия и порядок работы

Образцы лизируют в высокоденатурирующих условиях при комнатной температуре (15–25°C) в присутствии протеиназы К и буфера VXL, которые в совокупности обеспечивают инактивацию нуклеаз. Добавление буфера ACB позволяет скорректировать условия связывания для совместного выделения ДНК и РНК. Затем лизат переносят в колонку QIAamp Mini. Во время центрифугирования нуклеиновые кислоты адсорбируются кремнеземными мембранами, а примеси проходят через мембраны. Двухэтапная тщательная отмывка позволяет удалить оставшиеся примеси и ингибиторы ферментов, нуклеиновые кислоты элюируются в буфере AVE.

Качество результата не гарантируется для любого сочетания исходного материала и вида патогена и подлежит контролю со стороны пользователя. Для некоторых образцов может потребоваться предварительная обработка (см. Таблица 1, стр. 8).

Описание протоколов

Настоящее руководство предусматривает два типа протоколов. Образцы либо подвергаются процедуре выделения нуклеиновых кислот в исходном виде, либо проходят перед этой процедурой предварительную обработку.

Большинство типов образцов можно обрабатывать сразу, без предварительной обработки. Однако при некоторых сочетаниях исходного материала и целевого патогена может потребоваться один из протоколов предварительной обработки. В Таблица 1 на стр. 8 представлен обзор, показывающий соответствие протоколов предварительной обработки сочетаниям исходных материалов и патогенов.

- ☪ Протокол выделения нуклеиновых кислот (стр. 22)
- ☪ Протоколы предварительной обработки (стр. 25–36)

Таблица 1. Протоколы предварительной обработки для образцов физиологических жидкостей и тканей

Образец	Цель	Предварительная обработка	Страница
Физиологические жидкости, напр. цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, а также мазки или смывы, предварительно обработанные образцы тканей	РНК и ДНК вирусов, ДНК легколизируемых бактерий*	–	22
Цельная кровь или предварительно обработанные ткани	ДНК труднолизируемых бактерий*	Предварительная обработка В1 для труднолизируемых бактерий в цельной крови или предварительно обработанных тканях	25
Сыворотка крови, плазма крови, мазки, смывы, жидкости из полостей тела, моча	ДНК труднолизируемых бактерий*	Предварительная обработка В2 для труднолизируемых бактерий в бесклеточных жидкостях†	27
Большие объемы бесклеточных жидкостей (для обеспечения более высокой чувствительности)	ДНК легколизируемых бактерий*	Предварительная обработка В3 для легколизируемых бактерий в больших объемах бесклеточных жидкостей	29
Ткани, напр. ткани печени, селезенки, почек, лимфатических узлов	РНК и ДНК вирусов‡	Предварительная обработка Т1 механическое разрушение тканей	30
	ДНК вирусов§, ДНК бактерий¶	Предварительная обработка Т2 ферментативное расщепление тканей	31
	РНК и ДНК вирусов, ДНК бактерий¶	Предварительная обработка Т3 быстрое частичное разрушение тканей	33
Трудные для обработки ткани, напр. ткани головного мозга, поджелудочной железы, жировая клетчатка	РНК и ДНК вирусов, ДНК легколизируемых бактерий*, **	Предварительная обработка Т4 органическая экстракция для тканей, плохо поддающихся обработке	35

- * Грамположительные бактерии плохо поддаются лизису из-за жесткости клеточных стенок. Многие грамотрицательные бактерии лизируются легко, но лизис некоторых из них представляет трудность,— в таких случаях также целесообразна предварительная обработка В1 или В2
- † Не подходит для цельной крови.
- ‡ Не подходит для бактериальной ДНК, поскольку предполагает этап центрифугирования (см. стр. 30).
- § Не подходит для вирусной РНК, поскольку условия лизиса не позволяют в достаточной степени сохранить целостность РНК.
- ¶ Для труднолизируемых бактерий, затем используйте методику **предварительной обработки В1** (стр. 25).
- ** Не подходит для труднолизируемых бактерий, поскольку на этапе центрифугирования они будут уничтожены.

Протокол выделения нуклеиновых кислот

Протокол «**Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей**» (стр. 22) является оптимальным для выделения РНК и ДНК вирусов, а также ДНК легколизируемых бактерий из жидкого материала объемом до 200 мкл. Для прямой обработки данным методом подходят следующие исходные материалы:

- ☉ Цельная кровь
- ☉ Сыворотка крови
- ☉ Плазма крови
- ☉ Жидкости из полостей тела (напр., перитонеальная, синовиальная, цереброспинальная)
- ☉ Жидкости, экстрагированные из мазков (напр., назальных, фарингеальных, клоакальных)
- ☉ Смывные жидкости (напр., полученные методом бронхоальвеолярного лаважа)
- ☉ Другие физиологические жидкости, такие как моча*

* Обработка образцов с высоким содержанием ингибиторов, например образцов мочи, может потребовать уменьшения входного объема образца.

Методики предварительной обработки

Различные методики предварительной обработки, описываемые в настоящем руководстве, рассчитаны на определенные сочетания исходного материала и целевого патогена. Выбор методики предварительной обработки зависит от цели рабочего процесса, и следующим этапом работы должно быть выделение нуклеиновых кислот.

В Таблица 1 на стр. 8 представлено краткое описание методик предварительной обработки и их применения.

Для некоторых методик предварительной обработки могут быть необходимы дополнительные компоненты (см. стр. 13)

Предварительная обработка для выделения ДНК труднолизируемых бактерий

При работе с многими грамотрицательными бактериями для полного лизиса достаточно обработки химическими реактивами и протеиназой K, тогда как для грамположительных бактерий и некоторых грамотрицательных бактерий необходимо применять дополнительные методы с целью разрушения клеточных стенок. Для обеспечения максимальной эффективности лизиса при работе с труднолизуемыми бактериями рекомендуется применять метод механического разрушения с использованием пробирок для лизиса Pathogen, содержащих стеклянные шарики. Такие пробирки необходимо заказывать отдельно (информацию о заказе см. на стр. 43).

Для предварительной обработки труднолизируемых бактерий в цельной крови применяйте методику **предварительной обработки В1** (стр. 25).

Для предварительной обработки труднолизируемых бактерий в образцах бесклеточных физиологических жидкостей, таких как сыворотка крови, плазма крови, мазки, смывные жидкости, жидкости из полостей тела и моча, используйте методику **предварительной обработки В2** (стр. 27).

Для предварительной обработки труднолизируемых бактерий в образцах тканей используйте сначала одну из методик предварительной обработки тканей (см. стр. 10 и 25–36), а затем — методику **предварительной обработки В1** (стр. 25).

Дополнительная методика предварительной обработки для легколизируемых бактерий в больших объемах бесклеточных жидкостей

В случае необходимости, для повышения чувствительности при обнаружении ДНК легколизируемых бактерий в образцах физиологических жидкостей, не содержащих клеток или содержащих клетки в малых количествах, таких как сыворотка крови, плазма крови, другие бесклеточные физиологические жидкости, а также мазки и смывные жидкости, можно увеличить входной объем образца. В дальнейшем бактерии можно концентрировать методом осаждения центрифугированием.

Чтобы использовать увеличенный входной объем перед извлечением ДНК легколизируемых бактерий, применяйте методику **предварительной обработки В3** (стр. 29).

Предварительная обработка образцов тканей

Механическое или ферментативное разрушение структуры ткани является необходимым условием для выделения и очистки нуклеиновых кислот. Приводимые в этом разделе протоколы — это протоколы предварительной обработки тканей в рамках рабочих процессов, нацеленных на выделение РНК и ДНК вирусов, а также ДНК бактерий. Исходным материалом является образец ткани (например, ткани печени, лимфатического узла, селезенки или почки) массой до 25 мг.

Выбор методики предварительной обработки зависит от нужд рабочего процесса: целевого патогена, типа ткани, ожидаемой чувствительности при решении конкретной задачи, имеющегося лабораторного оборудования, а также от лимитов времени и трудозатрат. Представленные протоколы предварительной обработки подходят для большинства типов тканей и патогенов. Однако рекомендуется оценивать пригодность этих методик для каждого нового сочетания типа ткани и патогена.

Для выделения РНК и ДНК вирусов из тканей используйте методику **предварительной обработки Т1** (стр. 30). Эта методика предварительной обработки не подходит для выделения бактериальной ДНК, поскольку предполагает этап центрифугирования, которое может привести к значительной потере бактериальной ДНК с осажденным материалом.

Для выделения ДНК бактерий или вирусов из тканей используйте методику **предварительной обработки Т2** (стр. 31). Эта методика не подходит для выделения вирусной РНК, поскольку условия лизиса не позволяют в достаточной степени сохранить целостность РНК.

Как отмечается на стр. 10, при работе с определенными бактериями может потребоваться дополнительная предварительная обработка после **предварительной обработки T2**. Для выделения ДНК труднолизируемых бактерий из тканей после **предварительной обработки T2** выполните **предварительную обработку V1** (стр. 25).

Для некоторых задач частичного разрушения ткани при энергичном взбалтывании может быть достаточно для высвобождения из структуры ткани достаточного количества клеток, позволяющего достоверно определить патоген. Это бывает возможно при работе с тканями со слабой адгезией клеток, при нахождении патогена во внеклеточном пространстве, а также в случаях, когда клетки легко разъединяются или же велика патогенная нагрузка. В таких случаях может быть целесообразно проводить **предварительную обработку T3** (стр. 33) При работе с труднолизируемыми бактериями далее используйте методику **предварительной обработки V1** (стр. 25).

Некоторые типы тканей, например ткани поджелудочной железы или головного мозга, могут очень плохо поддаваться обработке из-за высокого содержания липидов и/или нуклеаз. Для извлечения из таких тканей РНК и ДНК вирусов, а также ДНК легколизируемых бактерий используйте методику **предварительной обработки T4** (стр. 35).

Оборудование и реактивы, обеспечиваемые пользователем

При работе с химическими веществами обязательно надевайте соответствующие халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Подробнее см. в соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции.

Для всех протоколов

- ☉ Пипеточные дозаторы и наконечники для пипеток с аэрозольным барьером (20–1000 мкл)
- ☉ Изопропиловый спирт
- ☉ Этиловый спирт (96–100 %)*
- ☉ Физиологический раствор с фосфатным буфером (ФРФБ) — может потребоваться для разведения образцов
- ☉ Микроцентрифуга
- ☉ Микроцентрифужные пробирки 2 мл
- ☉ Вихревая мешалка

Предварительная обработка В1 — для труднолизируемых бактерий в цельной крови или предварительно обработанных тканях

- ☉ Vortexer with Microtube foam insert (вихревая мешалка с вставкой из пеноматериала для микропробирок) (Scientific Industries, № по каталогу 504-0234-00), или TurboMix Attachment (насадка TurboMix) (Scientific Industries, № по каталогу SI-0564) или FastPrep®-24 (MP Biomedicals, № по каталогу 6004500), или TissueLyser II (№ по каталогу 85300) с TissueLyser II Adapter Set (набор адаптеров TissueLyser II) 2 x 24 (№ по каталогу 69982) либо 2 x 96 (№ по каталогу 69984), или TissueLyser LT (№ по каталогу 85600) с TissueLyser LT Adapter (адаптер TissueLyser LT) на 12 пробирок (№ по каталогу 69980)[†]
- ☉ Pathogen Lysis Tubes L (пробирки для лизиса Pathogen L) (№ по каталогу 19092) — в комплект входит 50 пробирок для лизиса Pathogen со стеклянными шариками и 1 флакон Reagent DX (реактив DX) (№ по каталогу 19088) для разрушения бактерий с помощью стеклянных шариков
- ☉ Buffer ATL (буфер ATL) (№ по каталогу 19076)

* Денатурированный спирт не подходит, так как содержит примесные вещества, такие как метиловый спирт или метилэтилкетон.

[†] Представленный перечень поставщиков не является полным, в него не включены многие крупные производители биологического оборудования.

Предварительная обработка В2 — для труднолизируемых бактерий в бесклеточных жидкостях

- ☪ Vortexer with Microtube foam insert (вихревая мешалка с вставкой из пеноматериала для микропробирок) (Scientific Industries, № по каталогу 504-0234-00), или TurboMix Attachment (насадка TurboMix) (Scientific Industries, № по каталогу SI-0564) или FastPrep-24 (MP Biomedicals, № по каталогу 6004500), или TissueLyser II (№ по каталогу 85300) с TissueLyser II Adapter Set (набор адаптеров TissueLyser II) 2 x 24 (№ по каталогу 69982) либо 2 x 96 (№ по каталогу 69984), или TissueLyser LT (№ по каталогу 85600) с TissueLyser LT Adapter (адаптер TissueLyser LT) на 12 пробирок (№ по каталогу 69980)*
- ☪ Pathogen Lysis Tubes L (пробирки для лизиса Pathogen L) (№ по каталогу 19092) или S (№ по каталогу 19091) — в комплект входит 50 пробирок для лизиса Pathogen со стеклянными шариками и 1 флакон Reagent DX (реактив DX) (№ по каталогу 19088) для разрушения бактерий с помощью стеклянных шариков
- ☪ Buffer ATL (буфер ATL) (№ по каталогу 19076)

Предварительная обработка Т1 — механическое разрушение тканей

- ☪ TissueLyser II (№ по каталогу 85300) с TissueLyser II Adapter Set (набор адаптеров TissueLyser II) 2 x 24 (№ по каталогу 69982), или TissueLyser LT (№ по каталогу 85600) с TissueLyser LT Adapter (адаптер TissueLyser LT) на 12 пробирок (№ по каталогу 69980), или другой шариковый гомогенизатор*

Примечание. Можно использовать также Vortexer with Microtube foam insert (вихревую мешалку с вставкой из пеноматериала для микропробирок) (Scientific Industries, № по каталогу 504-0234-00).

- ☪ шарики из нержавеющей стали 5 мм (№ по каталогу 69989)
- ☪ Физиологический раствор с фосфатным буфером (ФРФБ), рН 7,2 (50 ммоль фосфата калия, 150 ммоль NaCl) или NaCl 0,9 %

Предварительная обработка Т2 — ферментативное расщепление тканей

- ☪ Термошейкер, подходящий для пробирок для взятия образцов 2 мл
- ☪ Buffer ATL (буфер ATL) (№ по каталогу 19076)

* Представленный перечень поставщиков не является полным, в него не включены многие крупные производители биологического оборудования.

Важные замечания

Исходный материал

Не допускайте избыточного наполнения колонки QIAamp Mini. Это может привести к нарушению процесса выделения нуклеиновых кислот и/или ухудшению качества выполнения последующих процедур анализа. При работе с образцами с очень высоким содержанием нуклеиновых кислот хозяина (например, образцами определенных типов тканей, таких как ткани селезенки, или образцами крови с высоким содержанием клеток) используйте количество образца меньше максимального, рекомендованного в протоколе или предусмотренного методикой предварительной обработки. В ходе некоторых процедур на последующих этапах работы, таких как анализ методом ПЦР или ОТ-ПЦР, слишком высокие фоновые концентрации нуклеиновых кислот могут негативно отразиться на результате реакции. Используйте надлежащие контроли (напр., внутренний контроль) для проверки эффективности амплификации в результате ПЦР.

Не допускайте переноса в колонку QIAamp Mini материала, который может в дальнейшем засорить мембрану (напр., сгустков крови, плотных тканей, волокон из мазка).

Жидкости высокой вязкости могут требовать обработки, направленной на уменьшение вязкости, для эффективного извлечения нуклеиновых кислот патогенов. Соответствующие рекомендации можно получить в Технической службе QIAGEN.

Не допускайте повторного оттаивания и замораживания образцов: это может привести к уменьшению выхода нуклеиновых кислот и снижению качества результата.

Цельная кровь животных

Для выделения нуклеиновых кислот можно использовать образцы крови, обработанные ЭДТА, цитратом или гепарином в качестве антикоагулянта. Образцы могут быть как свежими, так и замороженными, при условии что они не замораживались и не оттаивались повторно. Образцы цельной крови после сбора можно хранить при температуре 2–8°C не более 6 часов. Для более длительного хранения рекомендуется делать аликвоты и замораживать их при температуре от –15 до –30°C или –80°C.

Рекомендуется использовать по 50–200 мкл на каждый образец. Как правило, при работе с большинством образцов крови можно использовать 200 мкл. Однако значительно повышенное содержание клеток на фоне воспалительных или неопластических заболеваний может приводить к сильному увеличению содержания в образце нуклеиновых кислот хозяина. В таких случаях уменьшение входного объема образца до 50 мкл может помочь улучшить результаты

последующих процедур анализа, особенно если используется метод ОТ-ПЦР. При использовании менее чем 200 мкл крови доведите объем образца до 200 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.

При работе с образцами крови, содержащими ядерные эритроциты (напр., взятыми у птиц или рыб), используйте 5–25 мкл крови и доведите объем образцов до 200 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.

Образцы сыворотки крови, плазмы крови, других физиологических жидкостей, мазки, а также смывы животного происхождения

Не допускается повторное оттаивание замороженной плазмы, а также сыворотки крови перед обработкой.

Мазки рекомендуется хранить в транспортной среде, например транспортной среде для вирусов (viral transport media, VTM) или бульоне с сердечно-мозговым экстрактом (brain–heart infusion broth, BHI). Извлеките тампон с мазком и выжмите из него жидкость, прижав его к внутренней стороне пробирки для хранения. При выделении вирусной РНК или ДНК рекомендуется кратковременно центрифугировать среду мазка, для того чтобы обеспечить полное удаление остатков твердых материалов.

Примечание. Твердые частицы, оставшиеся в жидком образце, могут скапливаться на колонке QIAamp Mini, что может приводить к снижению выхода нуклеиновых кислот.

Возможна обработка до 200 мкл сыворотки крови, плазмы крови, других физиологических жидкостей, супернатанта среды мазка или смывной жидкости.

В рамках протокола выделения нуклеиновых кислот необходимо использовать РНК-носитель во избежание потери нуклеиновых кислот в ходе процедуры (об использовании РНК-носителя см. на стр. 18).

При обработке образцов с очень высоким содержанием ингибиторов, например образцов мочи или суспензий фекалий, может возникать необходимость в уменьшении входного объема образца и/или дополнительной предварительной обработке с целью удаления ингибиторов. Чтобы уменьшить входной объем, используйте 25–50 мкл образца и доведите объем до 200 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.

При выделении бактериальной ДНК входной объем можно увеличивать более чем до 200 мкл, напр. до 1,5 мл, для повышения чувствительности анализа при детекции бактерий. См. в разделе **Предварительная обработка В2** (стр. 27) о выделении ДНК из труднолизируемых бактерий, а в разделе **Предварительная обработка В3** (стр. 29) — о выделении ДНК из легколизируемых бактерий.

Ткани животных

При работе с образцами тканей механическое или ферментативное разрушение структуры ткани является необходимым условием для высвобождения клеток, последующего высвобождения нуклеиновых кислот, а также прохождения материала через мембрану.

Различные типы тканей могут варьироваться в широких пределах в отношении текстуры и жесткости, типов клеток, а также содержания нуклеиновых кислот хозяина и ингибирующих веществ. Кроме того, эффективность локализации нуклеиновых кислот патогена в ткани может варьироваться в зависимости от типа ткани, патогена и стадии инфекционного поражения. Поэтому следует оценивать пригодность протоколов предварительной обработки, представленных в настоящем руководстве, применительно к каждому новому сочетанию ткани и патогена.

В качестве исходного образца можно использовать до 25 мг свежей или замороженной ткани. При работе с тканями с очень высоким содержанием клеток на единицу массы, например тканями селезенки, следует использовать меньшее количество исходного материала (5–10 мг).

Выход нуклеиновых кислот

Для образцов, содержащих небольшое количество клеток (напр., образцов сыворотки крови), выход получаемых вирусных или бактериальных нуклеиновых кислот может быть менее 1 мкг, в связи с чем количественный анализ с помощью спектрофотометра затруднен. Кроме того, элюаты, приготовленные с использованием РНК-носителя, могут содержать намного больше РНК-носителя, чем целевых нуклеиновых кислот. Протокол QIAamp *cador* Pathogen Mini предполагает выделение всех имеющихся нуклеиновых кислот. Поэтому ДНК и РНК клеток выделяются из любых клеток в образце вместе с РНК и ДНК вирусов, а также ДНК бактерий и не могут быть отделены от них при использовании методов спектрофотометрии. Для определения выхода нуклеиновых кислот патогенов рекомендуется использовать методы количественной амплификации, в частности метод количественной ПЦР в реальном времени или метод ОТ-ПЦР в реальном времени.

Использование РНК-носителя и внутренних контролей

РНК-носитель

РНК-носитель рекомендуется добавлять в физиологические жидкости, содержащие небольшое количество клеток, такие как сыворотка крови, плазма крови, среды мазков и смывные жидкости, поскольку это позволяет улучшить адсорбцию РНК и ДНК вирусов, а также ДНК бактерий кремнеземными мембранами, что особенно важно, когда целевые молекулы присутствуют в малых количествах. Помимо этого, при избыточном количестве РНК-носителя снижается вероятность деградации вирусной РНК в тех редких случаях, когда рибонуклеазы не денатурируются хаотропными солями и детергентами, которые содержатся в лизирующем буфере. Если РНК-носитель не используется, это может привести к снижению эффективности выделения нуклеиновых кислот патогена. Не добавляйте РНК-носитель в образцы цельной крови и тканей, а также в другие образцы с высоким содержанием клеток.

Внутренний контроль

Использование внутреннего контроля, например внутреннего контроля QIAGEN (предназначен для использования с наборами QuantiFast Pathogen с внутренним контролем, информацию о заказе см. на стр. 44), не является обязательным, и необходимо учитывать то, какая система амплификации используется. При использовании набора QIAamp *cador* Pathogen в сочетании с системами амплификации с внутренним контролем может потребоваться введение таких внутренних контролей в ходе процедуры выделения — с целью мониторинга эффективности приготовления образцов и последующего анализа.

Используемые в качестве внутренних контролей незащищенные нуклеиновые кислоты (напр., плазмидную ДНК или РНК, транскрибированную *in vitro*) следует добавлять только в лизат образца или буфер VXL. Не добавляйте такие нуклеиновые кислоты, служащие внутренними контролями, непосредственно в образец.

Количество добавляемого внутреннего контроля зависит от системы анализа и элюирующего объема. Надлежащее количество нуклеиновой кислоты, используемой в качестве внутреннего контроля, определяется пользователем. Для определения оптимальной концентрации внутреннего контроля см. инструкции производителя.

Хранение нуклеиновых кислот

В случаях краткосрочного хранения (до 24 часов) рекомендуется хранить очищенные РНК и ДНК вирусов, а ДНК бактерий при температуре 2–8°C. Если предполагается хранение в течение более 24 часов, то очищенные нуклеиновые кислоты рекомендуется хранить при температуре от –15 до –30°C, а в ряде случаев — при –80°C (для РНК).

Обращение с РНК

Рибонуклеазы — это высокостабильные и высокоактивные ферменты, для функционирования которых обычно не требуются кофакторы. Поскольку рибонуклеазы трудно инактивировать, а для разрушения РНК достаточно их ничтожного количества, не используйте никакую пластиковую или стеклянную лабораторную посуду, не устранив предварительно возможные загрязнения рибонуклеазами. Следует соблюдать особую осторожность во избежание непреднамеренного введения рибонуклеаз в образец РНК до или после процедуры очистки.

Подготовка реактивов

Исходный раствор РНК-носителя

Для использования лиофилизированную РНК-носитель необходимо сначала развести буфером AVE. Добавьте 310 мкл буфера AVE в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированной РНК-носителя, для получения исходного раствора концентрацией 1 мкг/мкл. Добавьте этот раствор в буфер VXL, как описано ниже. Неиспользованный раствор РНК-носителя в буфере AVE следует заморозить в аликвотах при температуре от –15 до –30°C. Не подвергайте аликвоты РНК-носителя заморозке и оттаиванию более 3 раз.

Внесение РНК-носителя в буфер VXL

Мы рекомендуем добавлять РНК-носитель в физиологические жидкости, содержащие небольшое количество клеток, такие как сыворотка крови, плазма крови, среды мазков и смывные жидкости. Не добавляйте РНК-носитель в образцы с высоким содержанием клеток, например образцы цельной крови и тканей. Присутствие в больших количествах фоновых нуклеиновых кислот может негативно повлиять на результаты последующих процедур анализа, например процедуры ОТ-ПЦР.

РНК-носитель, растворенная в буфере AVE, вносится в буфер VXL (см. протоколы начиная со стр. 22) таким образом, чтобы каждый образец содержал по 1 мкг РНК-носителя.

Примечание. На каждый препарат используется по 100 мкл буфера VXL, содержащего раствор РНК-носителя.

Примечание. РНК-носитель не растворяется в буфере VXL. Ее необходимо сначала растворять в буфере AVE.

Буферный раствор VXL, содержащий растворенную РНК-носитель, следует готовить свежим. При комнатной температуре (15–25°C) он сохраняет стабильность в течение не более 48 часов.

Протеиназа К QIAGEN

В набор QIAamp *cador* Pathogen Mini входит готовая к использованию протеиназа К, которая поставляется в специальном буфере для хранения. Активность раствора протеиназы К составляет 600 мЕОП/мл.

Протеиназа К QIAGEN сохраняет стабильность не менее 1 года после доставки при хранении при комнатной температуре (15–25°C). При хранении протеиназы К более 1 года, а также если температура окружающего воздуха часто превышает 25°C, рекомендуется использовать температуру 2–8°C.

Буфер ACB

Буфер ACB поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием необходимо добавить в него необходимое количество изопропилового спирта (100 %) — см. инструкции на флаконе и в табл. 2. Укажите, что изопропиловый спирт добавлен, отметив галочкой соответствующее поле на этикетке флакона. После добавления изопропилового спирта хорошо перемешайте содержимое флакона.

Таблица 2. Приготовление буфера ACB

Количество препаратов	Концентрат ACB	Изопропиловый спирт	Конечный объем
50	12 мл	8 мл	20 мл
250	60 мл	40 мл	100 мл

Буфер AW1

Буфер AW1 поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием необходимо добавить в буфер AW1 необходимое количество этилового спирта (96–100 %) — см. инструкции на флаконе и в табл. 3. Укажите, что этиловый спирт добавлен, отметив галочкой соответствующее поле на этикетке флакона. После добавления этилового спирта хорошо перемешайте содержимое флакона.

Таблица 3. Приготовление буфера AW1

Количество препаратов	Концентрат AW1	Этиловый спирт	Конечный объем
50	19 мл	25 мл	44 мл
250	98 мл	130 мл	228 мл

Буфер AW2

Буфер AW2 поставляется в виде концентрата. Перед первым использованием необходимо добавить в него необходимое количество этилового спирта (96–100 %) — см. инструкции на флаконе и в табл. 4. Укажите, что этиловый спирт добавлен, отметив галочкой соответствующее поле на этикетке флакона. После добавления этилового спирта хорошо перемешайте содержимое флакона.

Таблица 4. Приготовление буфера AW2

Количество препаратов	Концентрат AW2	Этиловый спирт	Конечный объем
50	17 мл	40 мл	57 мл
250	81 мл	190 мл	271 мл

Обращение с буфером AVE

При доставке буфер AVE не содержит рибонуклеаз. В его состав входит азид натрия — антимикробный агент, который предотвращает рост микроорганизмов, вырабатывающих рибонуклеазы. Однако поскольку этот буфер не содержит веществ, способствующих деградации рибонуклеаз, он не обеспечивает активного ингибирования рибонуклеаз, вносимых при неправильном обращении. Не допускайте загрязнения буфера AVE рибонуклеазами при работе с РНК. Принимайте общие меры предосторожности, предусмотренные для работы с РНК, такие как частая замена перчаток и содержание пробирок по мере возможности в закрытом виде.

Протокол: Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей

Данный протокол предусмотрен для выделения РНК и ДНК вирусов. А также ДНК легколизируемых бактерий из образцов физиологических жидкостей или образцов тканей, подвергнутых предварительной обработке. Объем образцов должен составлять не более 200 мкл.

Важные замечания перед началом работы

- ☉ Перед началом процедуры ознакомьтесь с разделом «Важные замечания» (стр. 15).
- ☉ Убедитесь, что буфер ACB, буфер AW1 и буфер AW2, а также РНК-носитель приготовлены в соответствии с инструкциями в разделе «Подготовка реактивов» (стр. 19).
- ☉ Убедитесь, что в буфере VXL или буфере ACB нет осадка. При необходимости выдержите буфер VXL или ACB в течение 30 минут при температуре 37°C, периодически встряхивая для растворения осадка.

Необходимые действия перед началом процедуры

- ☉ При необходимости разморозьте образцы и дайте им отстояться при комнатной температуре (15–25°C).
- ☉ Если объем образцов менее 200 мкл, доведите их до конечного объема 200 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.
- ☉ При необходимости приготовьте смесь буфера VXL и РНК-носителя согласно инструкциям в таблице 3 для использования на этапе 3 процедуры.

Примечание. Приготовьте смесь буфера VXL/РНК-носителя/внутреннего контроля в объеме на 10 % больше требуемого для всей совокупности процедур очистки образцов, которые предполагается выполнить.

Таблица 5. Приготовление смеси буфера VXL/РНК-носителя

Реактив	Количество образцов		
	1	12*	30*
Буфер VXL	100 мкл	1,32 мл	3,3 мл
РНК-носитель (1 мкг/мкл)	1 мкл	13 мкл	33 мкл

* Приготавливаемый объем составляет 110 % от требуемого объема, что необходимо для компенсации погрешности пипетирования и возможного испарения.

Порядок работы

1. С помощью пипетки перенесите 20 мкл протеиназы К в микроцентрифужную пробирку 2 мл (не входит в комплект поставки).

2. Добавьте к протеиназе К 200 мкл образца физиологической жидкости.

Примечание. При обработке образцов меньшего объема доводите объем образца до 200 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.

3. Добавьте 100 мкл буфера VXL. Закройте пробирку колпачком и перемешайте ее пульсационным способом.

Для обеспечения достаточного лизиса тщательно перемешивайте образец с буфером VXL до получения однородного раствора.

При работе с образцами физиологических жидкостей, содержащими буфер ATL, например после ферментативного расщепления тканей, могут образовываться осадки. Для растворения осадков кратковременно выдерживайте смесь при температуре 56°C.

Однако они не оказывают влияния на последующие этапы процедуры, предусмотренные протоколом.

Примечание. При обработке бесклеточных образцов перед использованием РНК-носителя убедитесь, что РНК-носитель внесена в количестве 1 мкг на каждые 100 мкл буфера VXL. Не добавляйте РНК-носитель при обработке образцов с высоким содержанием клеток, например образцов цельной крови или тканей.

4. Выдержите смесь при температуре 20–25°C в течение 15 мин.
5. Кратковременно центрифугируйте пробирку 2 мл для удаления капель с внутренней стороны крышки.
6. Добавьте в образец 350 мкл буфера ACB, закройте пробирку колпачком и тщательно перемешайте содержимое пульсационным способом.

Перед использованием буфера ACB убедитесь, что в его концентрат добавлен изопропиловый спирт.

7. Кратковременно центрифугируйте пробирку 2 мл для удаления капель с внутренней стороны крышки.
8. Перенесите лизат, полученный на этапе 7, в колонку QIAamp Mini, помещенную в пробирку для сбора образцов 2 мл, не замочив края. Закройте содержимое колпачком и центрифугируйте при 6000 x g (8000 об/мин) в течение 1 мин. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую пробирку для сбора образцов 2 мл и утилизируйте пробирку для сбора образцов, в которой находится фильтр.

Если лизат не полностью прошел через колонку в ходе центрифугирования, выполняйте центрифугирование повторно с более высокой скоростью (до 20 000 x g, 14 000 об/мин), пока колонка QIAamp Mini не станет пустой.

9. Откройте колонку QIAamp Mini и внесите в нее 600 мкл буфера AW1, не замочив края. Закройте содержимое колпачком и центрифугируйте при 6000 x g (8000 об/мин) в течение 1 мин. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую пробирку для сбора образцов 2 мл и утилизируйте пробирку с фильтратом.
10. Откройте колонку QIAamp Mini и внесите в нее 600 мкл буфера AW2, не замочив края. Закройте содержимое колпачком и центрифугируйте при 6000 x g (8000 об/мин) в течение 1 мин. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую пробирку для сбора образцов 2 мл и утилизируйте пробирку с фильтратом.
11. Центрифугируйте на полной скорости (20 000 x g, 14 000 об/мин) в течение 2 мин для высушивания мембраны.
12. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую микроцентрифужную пробирку 1,5 мл (не входит в комплект поставки) и утилизируйте пробирку для сбора образцов, в которой находится фильтрат. Откройте колонку QIAamp Mini и нанесите 50–150 мкл буфера AVE по центру мембраны. Закройте содержимое колпачком и выдержите при комнатной температуре (15–25°C) в течение 1 мин. Центрифугируйте на полной скорости (20 000 x g, 14 000 об/мин) в течение 1 мин.

Важно! Убедитесь, что элюирующий буфер доведен до комнатной температуры. Если элюирование выполняется с малым объемом (<75 мкл), то элюирующий буфер необходимо наносить по центру мембраны для полного элюирования связанных РНК и ДНК. Элюирующий объем не является фиксированным и может варьироваться в зависимости от нужд последующих процедур анализа.

В целях снижения уровня шума скорость центрифугирования для элюирования можно установить на 6000 x g. В этом случае объем выделенного элюата будет приблизительно на 5 мкл меньше объема элюирующего буфера, нанесенного на колонку.

Предварительная обработка В1 — для труднолизируемых бактерий в цельной крови или предварительно обработанных тканях

Данная методика предварительной обработки предусмотрена для выделения ДНК труднолизируемых бактерий из цельной крови или тканей, подвергнутых предварительной обработке.

Важные замечания перед началом работы

- ☉ Буфер ATL и пробирки для лизиса Pathogen L со стеклянными шариками (с реактивом DX в комплекте) необходимо заказывать отдельно (информацию о заказе см. на стр. 43).
- ☉ В буфере ATL при хранении может образовываться осадок. При необходимости разогревайте его до температуры 56°C, до полного растворения осадка.

Необходимые действия перед началом процедуры

- ☉ Перед использованием добавьте в 15 мл буфера ATL 100 мкл реактива DX. Если буфер ATL требуется в небольших количествах, перенесите 1,5 мл буфера в стерильный флакон 2 мл и добавьте 10 мкл реактива DX. Перед добавлением реактива DX хорошо перемешайте буфер. После приготовления данная смесь сохраняет стабильность в течение 6 месяцев при комнатной температуре (15–25°C).

Порядок работы

1. **Внесите 100 мкл буфера ATL (содержащего реактив DX) в свежую пробирку для лизиса Pathogen.**
2. **Добавьте 400 мкл крови или другой физиологической жидкости, используемой в качестве образца.**

При использовании меньших количеств исходного материала доводите объем образца до 400 мкл с помощью ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.

3. **Поместите пробирку для лизиса Pathogen в вихревую мешалку с вставкой из пеноматериала для микропробирок и перемешивайте содержимое в течение 10 мин на максимальной скорости.**

Вместо этого пробирку для лизиса Pathogen можно обработать на гомогенизаторе TissueLyser LT в течение 10 мин при частоте 50 Гц или гомогенизаторе FastPrep-24, применив настройку скорости 6,5 м/с, в течение двух периодов по 45 с с перерывом в 5 мин между ними.

4. Извлеките пробирку для лизиса Pathogen из мешалки и кратковременно центрифугируйте для удаления капель с внутренней стороны крышки.

Используйте 200 мкл супернатанта в качестве исходного материала для протокола «**Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей**» (стр. 22).

Предварительная обработка В2 — для труднолизируемых бактерий в бесклеточных жидкостях

Данная методика предварительной обработки предусмотрена для выделения ДНК труднолизируемых бактерий из бесклеточных физиологических жидкостей, таких как сыворотка крови.

Важные замечания перед началом работы

- ☉ Буфер ATL и пробирки для лизиса Pathogen L или S со стеклянными шариками (с реактивом DX в комплекте) необходимо заказывать отдельно (информацию о заказе см. на стр. 43).

Примечание. Выбор пробирок L либо S зависит от того, какие бактерии являются целевыми.

- ☉ В буфере ATL при хранении может образовываться осадок. При необходимости разогревайте его до температуры 56°C, до полного растворения осадка.

Необходимые действия перед началом процедуры

- ☉ Перед использованием добавьте в 15 мл буфера ATL 100 мкл реактива DX. Если буфер ATL требуется в небольших количествах, перенесите 1,5 мл буфера в стерильный флакон 2 мл и добавьте 10 мкл реактива DX. Перед добавлением реактива DX хорошо перемешайте буфер. После приготовления данная смесь сохраняет стабильность в течение 6 месяцев при комнатной температуре (15–25°C).

Порядок работы

- 1. Внесите до 1,5 мл образца физиологической жидкости в пробирку для лизиса Pathogen и центрифугируйте пробирку в течение 5 мин на максимальной скорости (>14 000 x g).**
- 2. Удалите и утилизируйте супернатант. При необходимости повторите действия 1 и 2.**

Супернатант удаляют с помощью пипетки, соблюдая осторожность во избежание удаления стеклянных шариков.
- 3. Добавьте 500 мкл буфера ATL (содержащего реактив DX) и ресуспендируйте осажденный материал.**

- 4. Поместите пробирку для лизиса Pathogen в вихревую мешалку с вставкой из пеноматериала для микропробирок и перемешивайте содержимое в течение 10 мин на максимальной скорости.**

Вместо этого пробирку для лизиса Pathogen можно обработать на гомогенизаторе TissueLyser LT в течение 10 мин при частоте 50 Гц или гомогенизаторе FastPrep-24, применив настройку скорости 6,5 м/с, в течение двух периодов по 45 с с перерывом в 5 мин между ними.

- 5. Извлеките пробирку для лизиса Pathogen из мешалки и кратковременно центрифугируйте для удаления капель с внутренней стороны крышки.**

Используйте 200 мкл супернатанта в качестве исходного материала для протокола «**Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей**» (стр. 22).

Предварительная обработка В3 — для легколизируемых бактерий в больших объемах бесклеточных жидкостей

Такая дополнительная предварительная обработка позволяет увеличить чувствительность анализа при использовании образцов большого объема для выделения ДНК легколизируемых бактерий из бесклеточных физиологических жидкостей, таких как сыворотка крови.

Порядок работы

- 1. Внесите до 1,5 мл образца физиологической жидкости в микроцентрифужную пробирку 2 мл и центрифугируйте в течение 5 мин на максимальной скорости (>14 000 x g).**
- 2. Удалите и утилизируйте супернатант. При необходимости повторите действия 1 и 2.**
- 3. Ресуспендируйте осажденный материал в 200 мкл ФРФБ путем интенсивного вихревого перемешивания.**

Используйте 200 мкл материала, полученного на этапе 3 в качестве исходного для протокола «**Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей**» (стр. 22).

Предварительная обработка T1 — механическое разрушение тканей

Такая предварительная обработка позволяет выделять РНК и ДНК вирусов из большинства типов тканей. Она не подходит для выделения бактериальной ДНК, поскольку включает этап центрифугирования.

Важное замечание перед началом работы

- ☉ Шарики из нержавеющей стали необходимо заказывать отдельно (информацию о заказе см. на стр. 43).

Порядок работы

1. Поместите до 25 мг тканей в микроцентрифужные пробирки 2 мл с 1 шариком из нержавеющей стали в каждой (средний диаметр — 5 мм).

При работе с тканями с очень высоким содержанием клеток на единицу массы (например, тканями селезенки), следует использовать меньшее количество исходного материала (5–10 мг).

При работе с волокнистой тканью разрезание ткани на мелкие части перед началом процедуры ее разрушения позволяет повысить эффективность разрушения.

2. Добавьте в каждую пробирку по 300 мкл ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl.
3. Поместите пробирки в адаптеры из набора адаптеров TissueLyser II.
4. Включите гомогенизатор TissueLyser II на 2 мин при частоте 25 Гц. **Необязательно:** При работе с очень волокнистыми тканями разберите набор адаптеров, поверните пробирочный штатив так, чтобы пробирки, располагавшиеся ближе всего к гомогенизатору TissueLyser II, стали самыми дальними от него, и снова соберите набор адаптеров. Включите гомогенизатор TissueLyser II еще на 2 мин при частоте 25 Гц.
5. Разберите набор адаптеров. Центрифугируйте образцы при 14 000 x *g* в течение 2 мин при комнатной температуре (15–25°C).
6. Используйте 200 мкл супернатанта, полученного на этапе 5, в качестве исходного материала для протокола «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).

При работе с сильно волокнистыми тканями не всегда удается добиться полного разрушения ткани. Следите за тем, чтобы на этап выполнения протокола выделения нуклеиновых кислот не попадали твердые частицы.

Предварительная обработка T2 — ферментативное расщепление тканей

Такая предварительная обработка позволяет выделять ДНК бактерий и вирусов из большинства типов тканей. Она не подходит для вирусной РНК, поскольку условия лизиса не позволяют в достаточной степени сохранить целостность РНК.

Важное замечание перед началом работы

- ☉ Буфер ATL необходимо заказывать отдельно (информацию о заказе см. на стр. 43).

Необходимые действия перед началом процедуры

- ☉ В буфере ATL при хранении может образовываться осадок. При необходимости разогревайте его до температуры 56°C, до полного растворения осадка.
- ☉ Нагрейте блок термомиксера, водяную баню-шейкер или шейкер-качалку до температуры 56°C для использования на этапе 3 протокола предварительной обработки.

Порядок работы

- 1. Разрежьте 25 мг ткани на мелкие куски и поместите в микроцентрифужную пробирку 2 мл. Добавьте 180 мкл буфера ATL.**

При работе с тканями с очень высоким содержанием клеток на единицу массы (например, тканями селезенки) следует использовать меньшее количество исходного материала (5–10 мг). Рекомендуется разрезать ткань на мелкие куски для обеспечения эффективного лизиса.

- 2. Добавьте 20 мкл протеиназы K. Закройте пробирку колпачком и тщательно перемешайте ее содержимое вихревым способом. Кратковременно центрифугируйте пробирку для удаления остатков раствора с колпачка.**

Примечание. При применении данной методики предварительной обработки не используйте протеиназу K на этапе 1 протокола последующего выделения нуклеиновых кислот («Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей», излагаемого на стр. 22). Такая процедура расщепления устраняет необходимость в использовании данного реактива на указанном последующем этапе работы.

3. Инкубируйте образец при температуре 56°C при постоянном перемешивании, пока ткань не будет полностью лизирована.

Время лизиса варьируется в зависимости от типа обрабатываемой ткани. Обычно полный лизис достигается через 1–3 ч. По мере удобства возможен лизис в ночное время, однако в каждом случае следует проводить оценку применительно к конкретным типам образцов.

После инкубации лизат может казаться вязким, но не должен быть желеобразным. Если после инкубации и перемешивания вихревым способом остается значительное количество желеобразного осажденного материала, увеличьте время инкубации при температуре 56°C для расщепления ткани с помощью протеиназы К и/или увеличьте количество протеиназы К до 40 мкл. В дальнейшем используйте меньшее количество исходного материала для препаратов данного типа ткани.

При отсутствии термомиксера, водяной бани-шейкера или шейкера-качалки инкубируйте материал в термостате или на водяной бане, периодически перемешивая во время инкубации, чтобы диспергировать образец.

4. Дополнительно (для ДНК вирусов и ДНК легколизируемых бактерий, не подходит для труднолизируемых бактерий): Если после лизиса в пробирках остаются плотные ткани или дебрис, добавьте 50 мкл буфера ATL. Перемешайте содержимое вихревым способом и центрифугируйте при 6000 x g (8000 об/мин) в течение 1 мин. Используйте 200 мкл супернатанта, полученного на этапе 5.

5. Используйте 200 мкл лизата в качестве исходного материала для этапа 5а или 5б.

Важно! Следите за тем, чтобы на этап выполнения следующего протокола не попадали твердые частицы.

5а. Для выделения ДНК вирусов или ДНК легколизируемых бактерий сразу перейдите к протоколу «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).

Примечание. Как указано выше, не используйте протеиназу К на этапе 1 протокола выделения нуклеиновых кислот.

5б. Для выделения ДНК из труднолизируемых бактерий перейдите к этапу предварительной обработки В1 (стр. 25).

Предварительная обработка T3 — быстрое частичное разрушение тканей

Такая предварительная обработка подходит для случаев, когда полного разрушения тканей не требуется. Она предусмотрена для извлечения РНК и ДНК вирусов, а также ДНК бактерий из тканей.

Важные замечания перед началом работы

При работе с некоторыми тканями и патогенами энергичного взбалтывания достаточно для разъединения клеток и/или высвобождения патогенов из структуры ткани. Обычно при такой предварительной обработке высвобожденные клетки не разрушаются. Лизис клеток в дальнейшем выполняется в рамках протокола **«Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей»** (стр. 22). Пригодность этого протокола зависит от силы адгезии клеток и/или локализации патогена в ткани, а также от требуемой чувствительности анализа при обнаружении патогена и должна оцениваться отдельно для каждого нового сочетания ткани и патогена.

Порядок работы

1. Поместите до 25 мг ткани в микроцентрифужную пробирку 2 мл.
2. Добавьте в образец 500 мкл ФРФБ и закройте пробирку крышкой.

При работе с большим количеством ткани скорректируйте соответствующим образом вносимый объем ФРФБ и используйте пробирку соответствующего размера. При расчете количества ткани и ФРФБ придерживайтесь соотношения приблизительно 1:20 (масса/объем). Убедитесь, что объем пробирки позволяет осуществлять энергичное взбалтывание.

3. Установите пробирку на вихревую мешалку, зафиксировав ее в адаптере из пеноматериала в вертикальном или горизонтальном положении.
4. Перемешивайте содержимое в течение 5 мин на полной скорости. Перейдите к этапу 5.

Важно! Не допускайте отстаивания образца более 1 мин после взбалтывания. Если образец находится в покое более 1 мин, запустите процедуру взбалтывания повторно на несколько секунд.

- 5. Используйте 200 мкл супернатанта в качестве исходного материала для протокола «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).**
Следите за тем, чтобы на этап выполнения протокола выделения нуклеиновых кислот не попадали твердые частицы.
- 5а. Для выделения ДНК вирусов или ДНК легколизируемых бактерий сразу перейдите к протоколу «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).**
- 5б. Для выделения ДНК из труднолизируемых бактерий перейдите к этапу предварительной обработки В1 (стр. 25).**

Предварительная обработка T4 — органическая экстракция для тканей, плохо поддающихся обработке

Данная методика предварительной обработки предусмотрена для извлечения РНК и ДНК вирусов, а также ДНК легколизируемых бактерий из тканей с высоким содержанием липидов и/или нуклеаз, например тканей головного мозга или поджелудочной железы.

Важное замечание перед началом работы

Фенол и хлороформ необходимо приобретать отдельно. Рекомендуется использовать равновесный раствор фенола, с уровнем pH 8, (напр., Sigma, № по каталогу P4557). Обязательно ознакомьтесь с требованиями к технике безопасности для этих химических веществ. Подробнее см. В соответствующих паспортах безопасности (ПБ), предоставляемых поставщиком продукции. Используйте подходящие пробирки с безопасной крышкой.

Необходимые действия перед началом процедуры

☪ Охладите микроцентрифугу до 4°C для использования на этапе 8.

Порядок работы

- 1. Поместите до 25 мг тканей в микроцентрифужные пробирки 2 мл с 1 шариком из нержавеющей стали в каждой (средний диаметр — 5 мм).**

При работе с тканями с очень высоким содержанием клеток на единицу массы (например, тканями селезенки), следует использовать меньшее количество исходного материала (5–10 мг).

При работе с волокнистой тканью разрезание ткани на мелкие части перед началом процедуры ее разрушения позволяет повысить эффективность разрушения.
- 2. Добавьте в каждую пробирку по 400 мкл ФРФБ или 0,9 % раствора NaCl и по 200 мкл фенола (ТЕ-насыщенного, pH 8) и плотно закройте пробирки крышками.**
- 3. Поместите пробирки в адаптеры из набора адаптеров TissueLyser II.**

4. **Включите гомогенизатор TissueLyser II на 2 мин при частоте 25 Гц.**

Необязательно: При работе с очень волокнистыми тканями разберите набор адаптеров, поверните пробирочный штатив так, чтобы пробирки, располагавшиеся ближе всего к гомогенизатору TissueLyser II, стали самыми дальними от него, и снова соберите набор адаптеров. Включите гомогенизатор TissueLyser II еще на 2 мин при частоте 25 Гц.

5. **Разберите набор адаптеров. Установив пробирки с гомогенатом на лабораторный стол, выдержите их при комнатной температуре (15–25°C) в течение 2–3 мин.**

Этот этап способствует диссоциации нуклеопротеиновых комплексов.

6. **Добавьте в пробирки 100 мкл хлороформа. Плотнo закройте каждую пробирку с гомогенатом и энергично взбалтывайте содержимое в течение 15 с вихревым способом или путем многократного переворачивания пробирки.**

Тщательное перемешивание важно для последующего фазового разделения содержимого.

7. **Установив пробирки с гомогенатом на лабораторный стол, выдержите их при комнатной температуре в течение 3 мин.**

8. **Центрифугируйте пробирки при 12 000 x g в течение 15 мин при температуре 4°C.**

После центрифугирования образец разделяется на 3 фазы: верхнюю бесцветную водную фазу, содержащую нуклеиновые кислоты; промежуточную фазу белого цвета и нижнюю органическую фазу. При работе с тканями с повышенным содержанием жира под органической фазой может быть видна еще одна прозрачная фаза. Объем водной фазы должен составлять приблизительно 300 мкл.

Важно! Если для протокола «**Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей**» (стр. 22) предполагается использовать ту же центрифугу, доведите эту центрифугу до комнатной температуры.

9. **Используйте 200 мкл верхней фазы, полученной на этапе 7, в качестве исходного материала для протокола «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).**

Руководство по поиску и устранению неполадок

Данное руководство по устранению неполадок может быть полезным в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Подробнее см. На странице «Frequently Asked Questions» (Часто задаваемые вопросы) сайта нашего центра технической поддержки:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Научные специалисты технической службы QIAGEN всегда готовы ответить на любые ваши вопросы, касающиеся как информации, содержащейся в настоящем руководстве, в том числе о протоколах, так и методик обработки образцов и проведения анализа (контактную информацию см. на последней странице обложки или на веб-сайте www.qiagen.com).

Комментарии и рекомендации

ДНК или РНК патогена присутствует в элюате в малом количестве либо отсутствует.

- | | |
|--|---|
| а) Неправильно приготовлен буфер ACB | Убедитесь, что концентрат буфера ACB разведен надлежащим объемом изопропилового спирта, как указано на флаконе. Используйте 100 % изопропиловый спирт. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами. |
| б) Неправильно приготовлен буфер AW1 или буфер AW2 | Убедитесь, что концентрат буфера AW1 или буфера AW2 разведен надлежащим объемом этилового спирта, как указано на флаконе. Используйте 96–100 % этиловый спирт. Не используйте денатурированный спирт. Он содержит посторонние вещества, такие как метиловый спирт или метилэтилкетон. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами. |

Комментарии и рекомендации

- в) Недостаточный лизис образца
Протеиназа К хранилась при повышенных температурах на протяжении слишком длительного периода времени. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот с новыми образцами и свежей протеиназой К (см. рекомендации по хранению на стр. 5).
При работе с некоторыми ДНК-вирусами и бактериями эффективность лизиса можно повысить проводя лизирование с подогревом. В этом случае необходимо тщательно перемешать образец после добавления протеиназы К, а затем инкубировать его в течение 15 мин при температуре 70°C.
- г) Колонка QIAamp Mini не выдерживалась с буфером AVE перед элюированием
После внесения буфера AVE колонку QIAamp Mini следует выдержать при комнатной температуре (15–25°C) в течение 1 мин.
- д) В буфер VXL не добавлялась РНК-носитель
При работе с образцами, содержащими малое количество клеток, отсутствие РНК-носителя может привести к снижению выхода нуклеиновых кислот патогенов. При обработке таких образцов разведите РНК-носитель в буфере AVE и добавьте полученный восстановленный раствор РНК-носителя в буфер VXL, как описано на стр. 19. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами.
- е) Деградация РНК-носителя
РНК-носитель, разведенная буфером AVE, хранилась при температурах не в диапазоне от –15 до –30°C либо многократно подвергалась замораживанию и оттаиванию. Возможно также, что смесь буфера VXL и РНК-носителя хранилась при температуре 2–8°C более 48 ч. Приготовьте новую пробирку с РНК-носителем, растворенной в буфере AVE, и перемешайте ее содержимое с буфером AL. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами.

Комментарии и рекомендации

- ж) Смесь буфера VXL и РНК-носителя плохо перемешана
Перемешивайте смесь буфера AL с РНК-носителем путем осторожного переворачивания пробирки не менее 10 раз.
- з) Загрязнение буфера AVE рибонуклеазами
При неоднократном открывании пробирок с буфером AVE соблюдайте осторожность во избежание внесения в них рибонуклеаз, присутствие которых может привести к деградации вирусной РНК. В случае загрязнения буфера AVE рибонуклеазами замените открытый флакон с ним новым флаконом. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами.
- и) Произошла деградация нуклеиновых кислот в образцах до их выделения
Образцы неоднократно подвергались замораживанию и оттаиванию или слишком долго хранились при комнатной температуре. Всегда используйте свежие образцы или образцы, размороженные только один раз. Повторите процедуру выделения нуклеиновых кислот по протоколу с новыми образцами.

ДНК или РНК плохо поддается анализу на последующих этапах работы

- а) ДНК или РНК присутствует в элюате в малом количестве либо отсутствует
См. возможные причины в пункте «ДНК или РНК патогена присутствует в элюате в малом количестве либо отсутствует» выше.
- б) При проведении реакции амплификации используется слишком большое количество элюата
Некоторые типы образцов могут содержать повышенное количество фоновых нуклеиновых кислот (напр., образцы цельной крови, тканей животных) или веществ, ингибирующих ПЦР (образцы фекалий). Присутствие фоновых нуклеиновых кислот в больших количествах может приводить к ингибированию реакций амплификации, а без специальной обработки удаление ингибиторов может быть неполным. Уменьшите количество образца на входе и/или количество элюата, вносимого при проведении реакции амплификации.

Комментарии и рекомендации

- в) Количество РНК-носителя в элюате слишком велико
Определите максимальное количество РНК-носителя, подходящее для проводимой реакции амплификации. Скорректируйте концентрацию раствора РНК-носителя, вносимого в буфер VXL, соответствующим образом.
- г) Эффективность анализа очищенных нуклеиновых кислот меняется по мере старения разведенных отмывочных буферов
Соли, а также этиловый спирт в составе буфера AW1 или буфера AW2 на последующих этапах работы могут отделяться в результате длительного хранения между процедурами приготовления препаратов. Всегда тщательно перемешивайте буферы перед приготовлением каждого препарата.
- д) Присутствие остатков этилового спирта в элюате
Выполните этап высушивания (этап 11), предусмотренный протоколом «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей» (стр. 22).

Появление осадка в буферах

- а) Осадок в буфере VXL или буфере ACB
Осадок может образовываться после хранения при низких температурах или в результате длительного хранения. Для растворения осадка выдержите буфер VXL или ACB в течение 30 минут при температуре 37°C, периодически встряхивая.
- б) Осадок в смеси образца и буфера VXL
При использовании образцов физиологических жидкостей, содержащих буфер ATL, то есть после ферментативного расщепления тканей, возможно образование осадка после добавления в образец буфера VXL (этап 3 в рамках протокола «Выделение нуклеиновых кислот патогенов из образцов физиологических жидкостей»). Присутствие осадка не влияет на последующие этапы работы, предусмотренные протоколом. Однако осадок можно растворить, кратковременно выдержав смесь при температуре 56°C.

Литература

Компания QIAGEN ведет большую постоянно обновляемую сетевую базу данных о научных публикациях, касающихся использования продукции QIAGEN. Обширный инструментарий поиска позволяет найти необходимые статьи как по ключевым словам, так и путем указания области применения, области научных исследований, заголовка и т. д.

См. полный перечень ссылок в сетевой справочной базе данных QIAGEN по адресу www.qiagen.com/RefDB/search.asp или обратитесь в техническую службу QIAGEN либо к региональному дистрибьютору.

Информация для заказа

Продукт	Комплектация	№ по каталогу
QIAamp <i>cador</i> Pathogen Mini Kit (50)	Для 50 препаратов: колонки QIAamp Mini, протеиназа K QIAGEN, РНК-носитель, буферы, пробирки для сбора образцов (2 мл)	54104
QIAamp <i>cador</i> Pathogen Mini Kit (250)	Для 250 препаратов: колонки QIAamp Mini, протеиназа K QIAGEN, РНК-носитель, буферы, пробирки для сбора образцов (2 мл)	54106
Buffer ATL (200 ml)	Буфер для лизиса тканей, 200 мл, для 1000 препаратов	19076
TissueLyser II	Шариковый гомогенизатор, 100-120/220-240 В, 50/60 Гц; необходим набор адаптеров TissueLyser 2 x 24 или набор адаптеров TissueLyser 2 x 96 (заказывается отдельно)*	85300
TissueLyser Adapter Set 2 x 24	2 набора адаптерных пластин и 2 штатива, предназначенные для использования с микроцентрифужными пробирками 2 мл на гомогенизаторе TissueLyser II	69982
TissueLyser Adapter Set 2 x 96	2 набора адаптерных пластин, предназначенные для использования с микропробирками для сбора образцов (на штативе) на гомогенизаторе TissueLyser II	69984
TissueLyser LT	Шариковый гомогенизатор, 100-240 В перем. тока, 50–60 Гц; необходим адаптер TissueLyser LT, на 12 пробирок (заказывается отдельно)†	85600

* Гомогенизатор TissueLyser II подлежит использованию в сочетании с набором адаптеров TissueLyser 2 x 24 или набором адаптеров TissueLyser 2 x 96.

† Гомогенизатор TissueLyser LT подлежит использованию в сочетании с адаптером TissueLyser LT, на 12 пробирок.

Продукт	Комплектация	№ по каталогу
TissueLyser LT Adapter, 12-Tube	Адаптер для разрушения тканей, позволяет обрабатывать до 12 образцов в микроцентрифужных пробирках 2 мл на гомогенизаторе TissueLyser LT	69980
Pathogen Lysis Tubes L	50 пробирок для лизиса Pathogen и 1 флакон реактива DX	19092
Pathogen Lysis Tubes S	50 пробирок для лизиса Pathogen и 1 флакон реактива DX	19091
Stainless Steel Beads, 5 mm (200)	200 шариков из нержавеющей стали (диаметром 5 мм), подходят для использования с системами TissueLyser	69989
Internal Control RNA (High conc.)	Приблизительно для 200 препаратов образцов (в зависимости от элюирующего объема): лиофилизированная РНК — внутренний контроль, буфер для разведения нуклеиновых кислот	211492
Internal Control DNA (High Conc.)	Приблизительно для 200 препаратов образцов (в зависимости от элюирующего объема): лиофилизированная РНК — внутренний контроль, буфер для разведения нуклеиновых кислот	211392
QuantiFast Pathogen PCR +IC Kit (100)	Для 100 x 25 мкл реакций: мастер-микс; лиофилизированная контрольная тест-система; лиофилизированная ДНК — внутренний контроль; раствор красителя ROX; раствор красителя High-ROX (высокой концентрации); вода, свободная от рибонуклеаз; буфер для разведения нуклеиновых кислот, буфер TE	211352

Продукт	Комплектация	№ по каталогу
QuantiFast Pathogen RT-PCR +IC Kit (100)	Для 100 x 25 мкл реакций: мастер-микс; RT-микс, лиофилизированная контрольная тест-система; лиофилизированная РНК — внутренний контроль; раствор красителя ROX; раствор красителя High-ROX (высокой концентрации); вода, свободная от рибонуклеаз; буфер для разведения нуклеиновых кислот, буфер TE	211452

Свежую информацию о лицензиях, а также заявления об отказе об ответственности применительно к конкретным продуктам см. в соответствующем руководстве к набору QIAGEN или руководстве пользователя. С руководствами к наборам QIAGEN и руководствами пользователя можно ознакомиться на веб-сайте по адресу www.qiagen.com. Их также можно заказать через техническую службу QIAGEN или регионального дистрибьютора.

Примечания

Товарные знаки: QIAGEN®, QIAamp®, *cado*® (QIAGEN Group); FastPrep® (MP Biomedicals LLC).

Ограниченное лицензионное соглашение для набора QIAamp *cado* Pathogen Mini

Использование настоящего продукта предполагает согласие всех покупателей или пользователей продукта со следующими условиями:

1. Продукт подлежит использованию исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к продукту, и настоящим руководством и исключительно с компонентами, входящими в состав набора. Компания QIAGEN не предоставляет лицензии в рамках своей интеллектуальной собственности на использование или объединение прилагаемых компонентов настоящего набора с какими-либо компонентами, не входящими в настоящий набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, предоставляемых вместе с продуктом, данным руководством и дополнительных протоколах, доступных по адресу www.qiagen.com. Некоторые из таких дополнительных протоколов предоставлены пользователями продукции компании QIAGEN для пользователей продукции компании QIAGEN. Такие протоколы не были всесторонне проверены или оптимизированы компанией QIAGEN. Компания QIAGEN не гарантирует их правильности и не подтверждает, что они не нарушают прав третьих лиц.
2. Кроме официально заявленных лицензий, компания QIAGEN не предоставляет никаких гарантий того, что данный набор и/или его использование не нарушают прав третьих лиц.
3. Данный набор и его компоненты лицензированы для однократного использования и не подлежат повторному использованию, переделке или перепродаже.
4. Компания QIAGEN отказывается от любых прочих лицензий, выраженных явно или подразумеваемых, кроме тех, о которых заявлено прямо.
5. Покупатель и пользователь данного набора соглашаются не совершать и не допускать совершения другими лицами каких-либо действий, которые могут привести к любым действиям, запрещенным выше, или способствовать им. Компания QIAGEN может требовать исполнения запретов, предусмотренных настоящим ограниченным лицензионным соглашением, в судебном порядке в любом суде и получать возмещения всех понесенных ею следственных и судебных издержек, включая стоимость юридических услуг, по любому иску, направленному на исполнение настоящего ограниченного лицензионного соглашения или любого из своих прав на интеллектуальную собственность, связанных с набором и/или его компонентами.

Текущие условия лицензии см. на веб-сайте по адресу www.qiagen.com.

© 2011-2014 QIAGEN. Все права защищены.

www.qiagen.com

Australia | techservice-au@qiagen.com

Austria | techservice-at@qiagen.com

Belgium | techservice-bnl@qiagen.com

Brazil | suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada | techservice-ca@qiagen.com

China | techservice-cn@qiagen.com

Denmark | techservice-nordic@qiagen.com

Finland | techservice-nordic@qiagen.com

France | techservice-fr@qiagen.com

Germany | techservice-de@qiagen.com

Hong Kong | techservice-hk@qiagen.com

India | techservice-india@qiagen.com

Ireland | techservice-uk@qiagen.com

Italy | techservice-it@qiagen.com

Japan | techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) | techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg | techservice-bnl@qiagen.com

Mexico | techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands | techservice-bnl@qiagen.com

Norway | techservice-nordic@qiagen.com

Singapore | techservice-sg@qiagen.com

Sweden | techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland | techservice-ch@qiagen.com

UK | techservice-uk@qiagen.com

USA | techservice-us@qiagen.com

