

Выделение нуклеиновых кислот из РНК-содержащих вирусов с использованием набора реагентов CleanRNA Standard (кат. # BC033)

ПРОТОКОЛ

Версия 1 от 22 апреля 2020 г.

Методика апробирована в 2009 году в НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского РАМН для диагностики вирусов А(Н1N1) и А(Н3N2).

В результате описанной ниже процедуры с применением набора реагентов CleanRNA Standard получается высокоочищенный препарат нуклеиновых кислот (ДНК/РНК), свободных от ингибиторов ПЦР. Препарат может использоваться для постановки реакции обратной транскрипции с целью получения комплементарной ДНК (кДНК), которую в дальнейшем используют для анализа вирусного патогена.

Общее время проведения процедуры выделения из 1 образца составляет 10-15 минут.

Материалом для проведения процедуры служит биологический материал: мазки со слизистых поверхностей, соскобы буккального эпителия с содержанием клеток не более 10^6 в образце.

Материалы для работы

- Пробирки на 1.5 мл типа эппендорф.
- Набор CleanRNA Standard для очистки препаратов суммарной РНК (кат. # BC033, Евроген), дополнительное количество «Связывающего раствора для РНК» (кат. # SD001B, Евроген).
- Стерильные одноразовые зонды-тампоны для забора биоматериала, например, зонд ПС+ Дакрон или урогенитальный Тип А «Универсальный» на пластиковой основе с синтетическим волокном.

Для сбора образцов нужно подготовить пробирки на 1.5 мл (типа эппендорф) содержащие в качестве транспортной среды 700 мкл «Связывающего раствора для РНК».

В состав «Связывающего раствора для РНК» входит 4М гуанидин тиоцианат, в котором происходит моментальная инактивация вируса, лизис вирусного капсида, а вирусная РНК переходит в раствор, в котором полностью инактивированы РНКазы.

Пробирка для забора должна иметь этикетку для маркировки простым карандашом. Это необходимо, чтобы надпись не стерлась при обеззараживании пробирок спиртовым раствором перед выделением РНК.

Меры предосторожности

Гуанидин тиоцианат оказывает раздражающее и токсичное действие.

При работе необходимо соблюдать правила общей и личной техники безопасности. Токсичен при попадании на кожу и внутрь. Вызывает ожоги.

При попадании на кожу промойте немедленно большим количеством воды и моющего средства (детергента).

Получение биоматериала

Забор биоматериала с поверхности слизистых производится стерильным зондом.

ВНИМАНИЕ! ПОСЛЕ СМАЧИВАНИЯ ЗОНДА ТРАНСПОРТИРОВОЧНЫМ СОСТАВОМ ЗОНД НЕ ДОЛЖЕН КОНТАКТИРОВАТЬ С КОЖНЫМИ ИЛИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ ПОКРОВАМИ.

После взятия материала рабочую часть зонда (кончик) поместить в пробирку с транспортной средой, после чего кончик обрезать (сломать), оставив его в пробирке. Пробирку плотно закрыть и заморозить, поместив в термосумку со льдом.

Образцы после забора хранить до 7 суток в замороженном виде и не более 1 суток при комнатной температуре.

Перед передачей в лабораторию пробирки с отобраным биоматериалом обработать спиртовым аэрозолем (этанол 80%) для инактивации вируса. Следить, чтобы надписи на пробирках не смывались при обработке спиртом.

Выделение РНК

Несмотря на то, что вирус в растворе дезактивирован, работы по выделению РНК должны производиться в ламинарном шкафу. Использовать одноразовые перчатки, халат, защитные очки и маску.

1. Расставить необходимое количество пробирок в штатив. Подписать каждую. Одну из пробирок подготовить под ОКО – контрольное выделение без биоматериала.
2. Разнести в пробирки по 350 мкл 96% этилового спирта.
3. Внести в пробирки по 350 мкл биоматериала в транспортной среде. В образец ОКО внести 350 мкл «Связывающего раствора для РНК».
4. Перемешать смесь переворачиванием пробирки. Пробирку с остатками пробы заморозить до получения результатов тестирования.
5. Поместить микроцентрифужные колонки в собирательные пробирки на 2 мл. Подписать на крышках.
6. Перенести смесь в промаркированные микроцентрифужные колонки и центрифугировать 30 секунд. Выбросить собирательную пробирку с фильтратом.

ВНИМАНИЕ! МАКСИМАЛЬНЫЙ ОБЪЕМ МИКРОЦЕНТРИФУЖНОЙ КОЛОНКИ – 800 мкл, ПОЭТОМУ УВЕЛИЧИВАТЬ ОБЪЕМЫ РАСТВОРОВ НЕ РЕКОМЕНДУЕТСЯ.

7. Поместить микроцентрифужную колонку в новую собирательную пробирку. Добавить в колонку 500 мкл «Промывочного раствора для РНК» и центрифугировать 30 секунд (8 000 g, 10 000 об/мин на настольной центрифуге).
 8. Выбросить собирательную пробирку с фильтратом.
 9. Повторить пункт 7.
 10. Центрифугировать микроцентрифужную колонку в новой собирательной пробирке 5 минут, для полного удаления промывочного раствора и осушения фильтра колонки. Выбросить собирательную пробирку.
 11. Поместить микроцентрифужную колонку в новую микроцентрифужную пробирку на 1.5 мл.
 12. Нанести в центр мембраны 50 мкл воды, свободной от РНКаз. Инкубировать 1-2 минуты.
- ВНИМАНИЕ!** ВОДА ДОЛЖНА БЫТЬ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАГРЕТА ДО 50-60 °С.
13. Центрифугировать 1 минуту.
 14. Выбросить колонку, пробирку закрыть и подписать.

Очищенный препарат содержит РНК вируса, если он был в пробе, а также геномную ДНК человека из биоматериала.

РНК может быть сразу использована для дальнейшей работы в реакции обратной транскрипции (ОТ) без разбавления.

Замороженная РНК хранится при температуре –20 °С и ниже в течение 1 года.