

Комплект реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР

(формат «Форез»)

Назначение

Комплект реагентов предназначен для качественного определения вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования в образцах плазмы крови методом ОТ-ПЦР.

Комплект может быть использован в клинической диагностике наиболее распространенных в России генотипов HCV (1a, 1b, 2a, 2b и 3).

Состав (на 50 определений)

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для обратной транскрипции		
• «ОТ-буфер»	100 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ-типирования HCV+дНТФ»	50 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	по 50 пробирок для каждого генотипа (1a, 2a, 1b, 2b, 3) и 50 пробирок «HCV-общий»
• Таq-полимераза	150 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	1,0 мл	3 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	6 пробирок
• Буфер для растворения	1,25 мл	1 пробирка
• Положительные контрольные образцы («К+»)	75 мкл	6 пробирок (по 1 пробирке для каждого генотипа (1a, 2a, 1b, 2b, 3) и 1 пробирка «HCV-общий»)

Инструкция по применению

Комплект реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР необходимо использовать совместно с комплектом реагентов для выделения ДНК/РНК (комплект ПРОБА-НК).

1. Постановка обратной транскрипции

- 1.1. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,
 где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- 1.2. Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 1.3. Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси в пробирки с 16,5 мкл выделенной РНК и встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.4. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 1.5. Термостатируйте пробирки при 40°C в течение 30 мин, затем инактивируйте обратную транскриптазу прогреванием при 95°C в течение 5 мин.
- 1.6. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.
- 1.7. К 20 мкл кДНК добавьте 20 мкл буфера для растворения.
- 1.8. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 1.9. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

Препарат кДНК готов для внесения в реакционную смесь для амплификации.

2. Постановка амплификации

- 2.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1a, 2a, 1b, 2b, 3 и «HCV-общий»): для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца «К+» и для отрицательного контрольного образца «К-».
- 2.2. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл Таq-полимеразы,
 где N+1 – количество промаркированных с учётом «К-» и «К+» пробирок (N) с запасом на 1 образец.
- 2.3. Добавьте в каждую промаркированную пробирку по 10 мкл приготовленной смеси, не повреждая слой парафина.
- 2.4. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла.
- 2.5. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирки, промаркированные «К-», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку и реакцию обратной транскрипции; в пробирки, промаркированные «К+», внесите по 5,0 мкл соответствующих положительных контрольных образцов.
- 2.6. Центрифугируйте пробирки при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

- 2.7. Установите все пробирки в амплификатор и проведите ПЦР в режиме, указанном в таблице 1, с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл. При использовании амплификатора «Терцик» необходимо выбрать алгоритм регулирования «Точный».

Таблица 1

Режим амплификации

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	1	30	94,0	1	30	1
2	94,0	0	20	94,0	0	50	5
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	20	
3	94,0	0	5	94,0	0	20	40
	64,0	0	5	64,0	0	20	
	72,0	0	5	72,0	0	20	
4	10,0	10,0	Хранение

3. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР

По окончании реакции амплификации результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза в агарозном геле (см. инструкцию к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза).

Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы ДНК красно-оранжевого цвета.

- 3.1. В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту ДНК определенного генотипа HCV (таблица 2). Наличие или отсутствие полосы внутреннего контроля в этом случае в учёт не принимают.
- 3.2. В отрицательных образцах, в том числе в отрицательных контрольных образцах, светящиеся полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту ДНК определенного генотипа HCV, должны отсутствовать, а полосы внутреннего контроля размером 900 п.н., должны быть отчетливо видны.
- 3.3. В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующие фрагменту ДНК определённого генотипа HCV и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контролю размером 900 п.н., результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.
- 3.4. В случае наличия полосы ДНК, соответствующей фрагменту ДНК определённого генотипа HCV, в отрицательных контрольных образцах, результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 2

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, п.н.
HCV	153
Генотип HCV 1a	278
Генотип HCV 1b	215
Генотип HCV 2a	262
Генотип HCV 2b	371
Генотип HCV 3	212
Внутренний контроль	900

Необходимо учитывать, что для вируса гепатита С характерен высокий полиморфизм, обуславливающий большое разнообразие генотипов, субтипов и вариаций. Помимо предложенных в данном наборе могут встречаться другие генотипы (2c, 2i, 4, 5, 6 и т.д.). Одним из критериев получения достоверного результата является выявление РНК вируса гепатита С, которое при отсутствии положительных результатов с генотипирующими праймерами свидетельствует о наличии редкого генотипа.

Условия хранения

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительных контрольных образцов, следует хранить при температуре минус 20°С в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается многократное замораживание ПЦР-буфера и минерального масла.

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительные контрольные образцы следует хранить в тёмном месте при 2–8°С в течение всего срока годности набора.

Срок годности комплекта – 9 месяцев с даты изготовления

По вопросам, касающимся комплекта реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР (формат «Форез»), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125Ж, к.6

Тел./факс +7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>