

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для последующей детекции методом гель-электрофореза (формат «Форез»)

Состав (на 100 определений)

Реактив	Количество	
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	100 пробирок
• Раствор Taq-полимеразы	500 мкл	2 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец («К+»)	150 мкл	1 пробирка

Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации (формат «Форез») в зависимости от наименования выпускаются на 100 или 50 определений (в пробирках 0,5 и 0,2 мл).

Инструкция по применению

1. Постановка амплификации

- 1.1. Промаркировать пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-» и положительного контрольного образца – «К+»).
- 1.2. Добавить в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы.
- 1.3. Добавить в каждую пробирку по 1 капле минерального масла.
- 1.4. Добавить в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирку, маркированную «К-», добавить 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку, в пробирку, маркированную «К+», добавить 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 1.5. Центрифугировать пробирки при 1000 об/мин в течение 3–5 с.
- 1.6. Установить все пробирки в амплификатор и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблицах, с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл. При использовании амплификатора Терцик необходимо выбрать алгоритм регулирования «Точный». Соответствие режимов амплификации комплектам реагентов приведено в таблице 5.

2. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК

По окончании реакции амплификации результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (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.

При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с внутренним контролем, в случае положительного образца возможны два варианта:

- 1) полоса ДНК на уровне положительного контрольного образца (таблица 5);
- 2) две полосы ДНК, одна из которых расположена на уровне положительного контрольного образца, а вторая соответствует ДНК внутреннего контроля.

В случае отсутствия специфической ДНК в образце (отрицательный образец) наблюдается только одна полоса, соответствующая ДНК внутреннего контроля.

Пустая дорожка геля (отсутствуют полосы внутреннего контроля и специфического фрагмента) свидетельствует о том, что реакция амплификации не прошла. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала.

При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК без внутреннего контроля, в случае положительного образца в геле наблюдается полоса ДНК на уровне положительного контрольного образца (таблица 5); в случае отсутствия специфической ДНК в образце (отрицательный образец) дорожка в геле пустая.

Условия хранения

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК следует хранить в тёмном месте при 2–8°C в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается хранение пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, в тёмном месте при 18–25°C в течение всего срока годности.

Срок годности комплекта – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для последующей детекции методом гель-электрофореза, следует обращаться в ООО «НПО ДНК-Технология» по адресу:

117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, 11 этаж

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/>

Таблица 1

Режим амплификации 1

№ 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	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	40
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 2

Режим амплификации 2

№ 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
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	40
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 3

Режим амплификации 3

№ 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
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	30
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 4

Режим амплификации 4

№ 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
	62,0	0	10	62,0	0	50	
	70,0	0	10	70,0	0	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	40
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	70,0	0	5	70,0	0	50	
4	10,0	10,0	Хранение

Длина продуктов ПЦР-амплификации

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Длина внутреннего контроля, пар нуклеотидов
Режим амплификации 1		
Хламидия трахоматис (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	415	900
Хламидия пневмонии (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)	254	–
Микоплазма гениталиум (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	440	900
Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma parvum</i>)	383	560
Уреаплазма уреалитикум (Т-960)(<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	206	560
Трихомонас вагиналис (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	218	560
Нейссерия гонореи (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	329	560
Цитомегаловирус (CMV)	280	560
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	310	560
Вирус герпеса человека 6 типа (HHV-6)	277	560
Вирус герпеса человека 8 типа (HHV-8)	293	560
Вирус папилломы типы 51, 26 (HPV 51, 26)	520	–
Вирус папилломы типы 6, 11 (HPV 6, 11)	372	–
Бордетелла пертуссис (<i>Bordetella pertussis</i>)	419	–
Легионелла пневмофила (<i>Legionella pneumophila</i>)	383	560
Хеликобактер пилори (<i>Helicobacter pylori</i>)	348	560
Коринебактерия дифтерии (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>) – токсигенные штаммы	251	560
Стрептококк группы А (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	435	–
Токсоплазма гондии (<i>Toxoplasma gondii</i>)	187	560
Холерный вибрион (<i>Vibrio cholerae</i>) токсигенные штаммы	508	–
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	185	560
Вирус варицелла зостер (VZV)	269	560
Режим амплификации 2		
Микоплазма хоминис (<i>Mycoplasma hominis</i>)	310	900
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>)	532	900
Вирус простого герпеса 1, 2 (HSV-1,2)	261	900
Вирус папилломы тип 16 (HPV 16)	367	900
Вирус папилломы тип 18 (HPV 18)	417	900
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс (<i>M.tuberculosis</i> – <i>M. bovis</i>)	330	900
Микобактерия туберкулеза (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	263	–
Режим амплификации 3		
Гарднерелла вагиналис (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	445	900
Режим амплификации 4		
Вирус папилломы тип 16, 31, 33, 35, 35Н, 52, 58, 67 (HPV 16, 31, 33, 35, 35Н, 52, 58, 67)	570/642*	–
Вирус папилломы тип 18, 45, 39, 59 (HPV 18, 45, 39, 59)	285–297**	–

* – Для комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК HPV 16, 31, 33, 35, 35Н, 52, 58, 67 при наличии в пробе ДНК HPV 33, 58, 67 продукт амплификации имеет длину 570 пар нуклеотидов, при наличии ДНК HPV 16, 31, 35, 35Н, 52 продукт имеет длину 642 пары нуклеотидов. В положительном контрольном образце ДНК амплифицируются оба продукта.

** – Для амплификационной системы HPV 18, 45, 39, 59 продукты имеют близкие длины (HPV18 – 285, HPV45 – 291, HPV39 – 294, HPV59 – 297 пар нуклеотидов), разница между которыми при детекции не видна.

ООО «НПО ДНК-Технология»
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru