

Комплекты реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) (формат «Real-time»)

Назначение

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

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

Состав (на 48 определений)

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для обратной транскрипции		
• «ОТ-буфер»	100 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ-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 48 пробирок для каждого генотипа (1a, 1b, 2, 3a/3b) и 48 пробирок «HCV-общий»
• Таq-полимераза	150 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	1,0 мл	3 пробирки
• Буфер для растворения	1,25 мл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	6 пробирок
• Положительные контрольные образцы («К+»)	75 мкл	по 1 пробирке для каждого генотипа (1a, 1b, 2, 3a/3b) 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-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 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 в пробирку «К-», 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 полученной кДНК добавьте 10 мкл буфера для растворения (из комплекта ПРОБА-НК).
- 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.

Для генотипирования можно использовать кДНК, полученную при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный. В этом случае перед постановкой ПЦР-амплификации необходимо выполнить п.п. 8–10 («Постановка обратной транскрипции»).

2. Постановка амплификации

- 2.1. Промаркируйте необходимое количество пробирок из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1a тип, 1b тип, 2 тип, 3a/3b тип и «HCV-общий»): для исследуемых образцов, для положительного контрольного образца «К+» и для отрицательного контрольного образца «К-».

Внимание! При генотипировании кДНК, полученной при работе с комплектами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, комплект «HCV-общий» не используется в исследовании.
- 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+» (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 пробирку, промаркированную «К-», внесите 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего прободготовку и реакцию обратной транскрипции; в пробирку, промаркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 2.6. Центрифугируйте пробирки при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.7. Установите все пробирки в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1 и 2, с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл.

Таблица 1

Режим амплификации для ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	2	00	1		Цикл
	94	1	00			
2	94	0	10	50	√	Цикл
	62	0	20			
3	10	Хранение		Хранение

Таблица 2

Режим амплификации для iCycler iQ (Bio-Rad)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, C°	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1	1	00:30	80,0	
		2	01:00	94,0	
2	5	1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2	1	00:20	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45	1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
5		10,0	storage

3. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР

Детекция и учёт результатов осуществляется на приборах ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями к приборам.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации специфического продукта и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

Комплект реагентов «HCV-общий» служит дополнительным контролем наличия/отсутствия РНК вируса гепатита С (HCV) в исследуемом образце плазмы.

Таблица 3

Таблица по учёту и интерпретации результатов проведённого исследования

Экспоненциальный рост уровня флуоресценции (положительный результат)			Интерпретация результата исследования
Один из генотипов HCV (1a, 1b, 2, 3a/3b)	HCV-общий	Внутренний контроль	
+	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С _____ генотипа
-	-	+	РНК вируса гепатита С не обнаружена
-	-	-	Результат недостоверный
-	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С, тип не идентифицирован

При получении положительных результатов по двум генотипам на одном образце (например, генотипы 1a и 1b) с интервалом по Ct более 3-х циклов, положительным считать сигнал с наименьшим значением Ct. Сигнал с бóльшим значением Ct считать перекрестной неспецифической реакцией (рис.1).

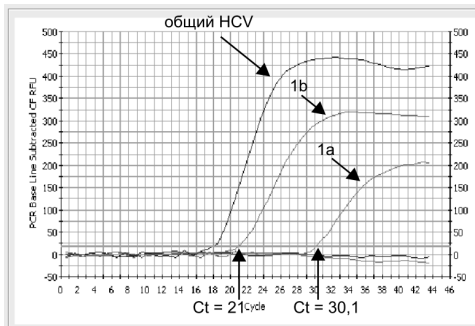


Рисунок 1. Интерпретация: выявлен генотип 1b.

Необходимо учитывать, что для вируса гепатита С характерен высокий полиморфизм, обуславливающий большое разнообразие генотипов и субтипов. Поэтому положительный результат на «HCV-общий» и отсутствие сигнала на все 4 генотипа, предложенных в данном наборе, может свидетельствовать о наличии других вариантов HCV в исследуемом образце (например, генотипы 4, 5 и 6).

Условия хранения

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

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в тёмном месте при 2–8°C в течение всего срока годности.

Срок годности комплектов – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для генотипирования вируса гепатита С методом ОТ-ПЦР, 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 нашем сайте: <http://www.dna-technology.ru/support>

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