

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления ДНК
возбудителя туляремии (*Francisella tularensis*)
методом полимеразной цепной реакции

Francisella tularensis

ВНИМАНИЕ!

***Francisella tularensis* относится ко II группе патогенности. Все работы необходимо проводить в соответствии с МУ 1.3.2569–09 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности»**

Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов FRANCISELLA TULARENSIS предназначен для выявления ДНК возбудителя туляремии (*Francisella tularensis*) в биологическом материале человека (в отделяемом из язв, пунктате из бубонов, мокроте, фекалиях, биоптатах и др.), в материале от падших и больных животных, в клещах, комарах и эктопаразитах, в смывах с предметов окружающей среды и др. методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов FRANCISELLA TULARENSIS основан на использовании процесса амплификации ДНК методом ПЦР. Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

В наборе FRANCISELLA TULARENSIS в смесь для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции.

В смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации ДНК возбудителя туляремии и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы).

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделенных прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном

прогреве пробирки.

2.2. Состав набора

Набор состоит из следующих комплектов:

1. Комплект реагентов для выделения ДНК из биологического материала включает:

- лизирующий раствор – 7,5 мл (1 флакон);
- сорбент – 1,0 мл (1 пробирка);
- промывочный раствор №1 – 10 мл (1 флакон);
- промывочный раствор №2 – 10 мл (1 флакон);
- промывочный раствор №3 – 10 мл (1 флакон);
- элюирующий раствор – 5 мл (1 флакон).

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с комплектом для ПЦР-амплификации можно узнать у представителя компании.

2. Комплект реагентов для ПЦР-амплификации:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 48 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Таq-полимеразы – 1 пробирка (500 мкл);
- буферный раствор «ПЦР-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

2.3. Время проведения анализа - 4 ч.

2.4. Каждый набор рассчитан на проведение 48 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала, содержащих ДНК возбудителя туляремии (*Francisella tularensis*), после проведения реакции амплификации ПЦР-детектор должен регистрировать положительный результат.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК возбудителя туляремии (*Francisella tularensis*), ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат.

3.2. Аналитическая чувствительность

Аналитическая чувствительность набора: не более 1000 микробных клеток на 1,0 мл образца.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569–09.

4.2. Мерами предосторожности является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. Работать с набором следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.5. При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

4.7. Выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

4.8. Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК и проведения ПЦР следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах,

снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

- 4.9.** Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.
- 4.10.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.11.** Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.
- 4.12.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- 4.13.** Дезактивацию отработанных реагентов, обработку одежды, обеззараживание исследуемого материала проводят в соответствии МУ 1.3.2569-09 и СП 1.3.1285-03.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09.

При работе с набором реагентов FRANCISELLA TULARENSIS требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор;
- ПЦР-детектор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 50°C;
- микроцентрифуга/вортекс;

- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл; 1-200 мкл; 100-1000 мкл;
- одноразовые наконечники с аэрозольным барьером для автоматических пипеток объёмом 1-20 мкл;
- одноразовые перчатки резиновые;
- физиологический раствор (0,9% NaCl) стерильный.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с МУ 1.3.2569–09.

ВНИМАНИЕ! В результате предобработки образцов необходимо получить 0,2-0,5 мл анализируемого материала (суспензии бактериальных клеток) в пробирке пластиковой объёмом 1,5 мл.

Полученный материал использовать для выделения ДНК.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Подготовка суспензии бактериальных клеток к выделению ДНК

7.1.1. Пробирку, содержащую анализируемый материал (суспензию бактериальных клеток), центрифугировать при 13000 об/мин в течение 10 мин.

7.1.2. Удалить надосадочную жидкость, оставив в пробирке примерно 50 мкл (осадок + жидкая фракция).

7.2. Выделение ДНК из биологического материала

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец «К-». Для этого в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл внести 50 мкл (или другое количество в соответствии с инструкцией к комплекту) физиологического раствора стерильного. Далее проводить пробоподготовку в пробирке «К-», не содержащей анализируемого материала, в

соответствии с инструкцией.

- 7.2.1. Для обработки нескольких анализируемых образцов в отдельной пластиковой пробирке смешать
- 150 x (N+1) мкл лизирующего раствора,
 - 20 x (N+1) предварительно ресуспендированного сорбента,
- где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец
- 7.2.2. Добавить по 170 мкл полученной смеси в каждую пробирку с образцом и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

ВНИМАНИЕ! При использовании в качестве анализируемого образца биопсийного материала и тканей животных добавить в пробирки, содержащие анализируемый материал, 150 мкл лизирующего раствора (без сорбента!), закрыть крышки пробирок, встряхнуть пробирки на вортексе.

- 7.2.3. Термостатировать пробирки в течение 20 мин при 50 °С. Удалить из пробирок нелизированный материал, добавить 20 мкл предварительно ресуспендированного сорбента, закрыть крышки пробирок и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 сек.
- 7.2.4. Термостатировать пробирки при 50 °С в течение 20 мин.
- 7.2.5. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.2.6. Удалить надосадочную жидкость.
- 7.2.7. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №1 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.2.8. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.2.9. Удалить надосадочную жидкость.
- 7.2.10. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №2 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.2.11. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.2.12. Удалить надосадочную жидкость.
- 7.2.13. Добавить к осадку 200 мкл промывочного раствора №3 и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.

- 7.2.14. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.
- 7.2.15. Удалить надосадочную жидкость.
- 7.2.16. Открыть крышку пробирок и термостатировать пробирки при 50 °С в течение 5 мин.
- 7.2.17. Добавить к осадку 100 мкл элюирующего раствора и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3-5 с.
- 7.2.18. Термостатировать пробирки при 50 °С в течение 5 мин.
- 7.2.19. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, готова к внесению в смесь для амплификации.

Полученный препарат ДНК можно хранить до 7 суток при температуре 2-8 °С. Перед использованием препарата ДНК для постановки ПЦР необходимо повторить п.7.2.17 - 7.2.18.

Если препарат ДНК предполагается хранить более 7 суток, необходимо надосадочную жидкость (п.7.2.19) перенести в новую пробирку и хранить при температуре минус 20 °С в течение 6 месяцев.

Примечание. В лизирующем растворе и в промывочном растворе №1 допускается выпадение осадка; перед началом работы его необходимо растворить нагреванием флакона при 50 °С в течение 15-20 мин.

7.3. Проведение полимеразной цепной реакции

- 7.3.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца - «К-», для положительного контрольного образца - «К+», две пробирки («ФОН») для контроля фона флуоресценции.
- 7.3.2. Во все промаркированные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавить по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. В пробирки, промаркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 7.3.3. В каждую пробирку добавить по 1 капле минерального масла (примерно 20 мкл), плотно закрыть пробирки.
- 7.3.4. Внести в промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК

(кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы ДНК наконечниками с аэрозольным барьером.

- 7.3.5. В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК (п.7.2), а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 7.3.6. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 3-5 с.
- 7.3.7. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1

Режим амплификации для амплификатора Терцик
(ООО «НПО ДНК–Технология»)
Алгоритм регулирования – «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °C	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	00	1
2	94,0 67,0	0 0	5 15	5
3	94,0 67,0	0 0	1 15	40
4	10,0	хранение

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов необходимо уточнить программу амплификации у представителя компании.

Продукты амплификации можно хранить при температуре 2-8 °C в течение 24 часов.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЦР-ДЕТЕКТОРА «ДЖИН»

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор «ДЖИН» (ООО «НПО ДНК-Технология»), оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10, для внутреннего контрольного образца - 2,50).

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-ДЕТЕКТОРА

9.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором.

9.2. В биологических образцах, содержащих ДНК возбудителя туляремии (*Francisella tularensis*), программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

9.3. В биологических образцах, не содержащих ДНК возбудителя туляремии, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

9.4. В случае отрицательного результата на наличие ДНК возбудителя туляремии и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате ДНК, полученном из биологического 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 биологического материала.

9.5. Программа фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфики (наличие ДНК возбудителя туляремии) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учёт не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.4).

9.6. При получении положительного результата на наличие ДНК возбудителя туляремии для отрицательного контрольного образца «К-», результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВАНИЯ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

10.2. Комплекты реагентов для выделения ДНК из биологического материала и ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности.

10.3. Транспортирование набора осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

10.4. После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- лизирующий раствор, промывочный раствор № 1, промывочный раствор № 2, промывочный раствор № 3 хранить при комнатной температуре (18-25 °С) в течение всего срока годности набора; лизирующий раствор и промывочный раствор №1 следует хранить в тёмном месте;
- сорбент, элюирующий раствор хранить при температуре 2-8 °С в течение всего срока годности набора.

10.5. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.7. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и эксплуатации, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества наборов FRANCISELLA TULARENSIS, следует обращаться в ООО «НПО ДНК-Технология» по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: mail@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Номер 122-1
01.09.10

ООО «НПО ДНК-Технология»
117587, Москва, Варшавское ш., д.125Ж, корп.6, этаж 11
телефон/факс (495) 980-45-55
e-mail: mail@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru