

**Комплекты реагентов
 для проведения обратной транскрипции и
 ПЦР-амплификации кДНК вирусов
 гриппа А – Influenza A virus;
 гриппа В – Influenza B virus;
 пандемического гриппа А (H1N1), подобных штамму
 А/California/4/2009 («свиной грипп») – ПАН H1N1**

Информация о комплектах

Назначение:

Комплекты реагентов предназначены для выявления *in vitro* РНК вирусов гриппа А – Influenza A virus, гриппа В – Influenza B virus и пандемического гриппа А(H1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп») – ПАН H1N1.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа и ротоглотки (Influenza A virus, Influenza B virus, ПАН H1N1), материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) (Influenza A virus)

Выделение РНК:

Рекомендуется комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности комплектов:

Внутренний контрольный образец (ВК) – присутствует в каждой пробирке с амплификационной смесью, необходим для оценки прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТ-96 и ДТлайт*; версия программного обеспечения не ниже 7.3.

* – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

Количество определений:

48

Состав комплектов

Реактив	Количество	
Состав комплекта для проведения обратной транскрипции		
• «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»	50 мкл	1 пробирка
• Буферный раствор «ОТ-буфер»	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Состав комплекта для ПЦР-амплификации кДНК		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	48 пробирок
• ПЦР-буфер	500 мкл	1 пробирка
• Taq-полимераза	25 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец («К+»)	75 мкл	1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

FAM	HEX	Rox	Cy5
Influenza A virus	ВК	-	-
Influenza B virus	ВК	-	-
ПАН H1N1	ВК	-	-

Инструкция по применению

1. Выделение РНК

При использовании комплекта реагентов ПРОБА-НК осадок после сушки следует растворять в 50 мкл буфера для растворения. ДНК-ВК и РНК-ВК не используются.

2. Подготовка и проведение обратной транскрипции

- 2.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объемом 0,5 мл.
- 2.2. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25°C), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.3. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- 2.4. Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.5. Добавьте в промаркированные пробирки по 3,5 мкл ОТ-смеси.
- 2.6. Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 16,5 мкл соответствующего образца РНК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку «К-» РНК не вносится.
- 2.7. В пробирку, маркированную «К-», внесите 16,5 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК.
- 2.8. Встряхните пробирку на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.9. Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40°C в течение 30 мин, затем прогрейте при 95°C в течение 5 мин.
- 2.10. Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек. Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 3.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца («К+») и отрицательного контрольного образца («К-») по одной пробирке с запечатанной парафином смесью для амплификации.
- 3.2. Перемешайте ПЦР-буфер и Таq-полимеразу на микроцентрифуге/вортексе, центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.
- 3.3. 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 анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.
- 3.4. Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Таq-полимеразой в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 3.5. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Таq-полимеразой.
- 3.6. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
Примечание. Для предотвращения контаминации следует перед внесением образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Образцы следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.
- 3.7. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 3.8. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 3.9. Центрифугируйте пробирки при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 1–3 с.
- 3.10. Установите все пробирки в амплификатор детектирующий и проведите ПЦР с учётом объема реакционной смеси, равного 35 мкл (Таблица 1). Оформление протокола (тип анализа «Качественный») проводится в соответствии с инструкцией к прибору.

Программа амплификации
для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТ-96 и ДТлайт.

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	0	30	1		Цикл
	94,0	1	30			
2	94,0	0	30	5		Цикл
	64,0	0	15		√	
3	94,0	0	10	45		Цикл
	64,0	0	15		√	
4	10,0	Хранение		Хранение

4. **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТ-96 и ДТлайт.

Условия хранения

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

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

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

Срок годности комплектов – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А – Influenza A virus; гриппа В – Influenza B virus; пандемического гриппа А (H1N1), подобных штамму A/California/4/2009 («свиной грипп») – Пан H1N1, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 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 нашем сайте: <http://www.dna-technology.ru/support>