

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления
ДНК боррелии бургдорфери (*Borrelia burgdorferi*)
методом полимеразной цепной реакции

БОРРЕЛИО-ГЕН

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Комплект реагентов предназначен для выявления ДНК боррелии бургдорфери (*Borrelia burgdorferi*) *in vitro* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1. Принцип действия

Комплект реагентов БОРРЕЛИО-ГЕН основан на использовании процесса амплификации фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Для оценки эффективности протекания полимеразной цепной реакции в смеси для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК).

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

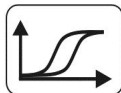
ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации искомой ДНК и внутреннего контрольного образца, мечены различными флуоресцентными метками, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации ДНК боррелии бургдорфери и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР используются детектирующие амплификаторы или специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы).

2.2. Состав комплекта

В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплект реагентов для ПЦР-амплификации выпускается в двух форматах:



«FLASH» - предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР-детектора (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).



«Real-time» - предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 50 пробирок (по 20 мкл);
- раствор Таq-полимеразы – 1 пробирка (500 мкл);
- буферный раствор «ПЦР-буфер» – 1 пробирка (100 мкл);
- минеральное масло – 1 пробирка (1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (75 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры, флуоресцентные ДНК-зонды, внутренний контрольный образец.

Буферный раствор «ПЦР-буфер» включён только в комплекты формата «FLASH».

2.3. Время проведения анализа – 5 ч.

2.4. Каждый комплект рассчитан на проведение 50 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 боррелии бургдорфери, после проведения реакции амплификации, ПЦР-детектор или детектирующий амплификатор должен регистрировать положительный результат.

При использовании метода гель-электрофореза, кроме полосы оранжево-красного цвета, соответствующей специфическому продукту амплификации ДНК – 335 п.н., возможно появление дополнительных полос.

В образцах биологического материала, не содержащих ДНК боррелии бургдорфери, после проведения реакции амплификации, ПЦР-детектор или детектирующий амплификатор должен регистрировать отрицательный результат.

При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая специфическому продукту амплификации ДНК – 335 п.н. должна отсутствовать, при этом полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу (560 п.н.), должна быть отчетливо видна. Кроме того, возможно появление дополнительных полос.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1.** Меры предосторожности – 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, 1981г.).
- 4.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.
- 4.3.** Работать с набором следует в одноразовых резиновых перчатках без талька.
- 4.4.** При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.
- 4.5.** Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.
- 4.6.** Приготовление реакционной смеси и выделение ДНК следует проводить в ПЦР-боксах или ламинарных шкафах с выключенным ламинарным потоком.

- 4.7.** Для предотвращения контаминации, этапы выделения ДНК, проведения ПЦР и электрофореза следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.
- 4.8.** Все 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.
- 4.9.** Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.
- 4.10.** Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.
- 4.11.** Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после проведения работ в течение 1 часа.
- 4.12.** Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.
- 4.13.** При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

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

При работе с комплектом реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор;
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;

- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40-95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- пробирки пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки пластиковые объёмом 0,6 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом 0,5-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл;
- 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;
- пестики-гомогенизаторы для пробирок пластиковых объёмом 1,5 мл.

При работе с комплектом в формате «FLASH» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Образцы плазмы крови человека

6.1.1. Взятие крови производится в пластиковые пробирки объёмом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза после взятия материала. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования следует при температуре 2–8°С.

6.1.2. Центрифугировать пробирки с кровью при 3000 об/мин в течение 20 мин.

6.1.3. Отобрать верхнюю фракцию (плазма) и перенести в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

ВНИМАНИЕ! Время от взятия крови до получения плазмы не должно превышать 6 часов.

Хранить полученную плазму можно при температуре минус 20°C не более 3 мес.

6.2. Иксовые клещи

6.2.1. Живого клеща поместить в чистую посуду, в которую предварительно необходимо положить кусок влажной ткани или смоченную водой салфетку (чтоб не допустить высыхания клеща). Транспортировать и хранить живого клеща до начала исследования рекомендуется при температуре 2–8°C в увлажненной среде не более 48 часов.

6.2.2. Для исследования поместить клеща в пластиковую пробирку вместимостью 1,5 мл.

6.2.3. Добавить 1,0 мл 96% этанола в пробирку с клещом, встряхнуть пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе.

6.2.4. Полностью удалить надосадочную жидкость.

6.2.5. Добавить 1,0 мл стерильного физиологического раствора, встряхнуть пробирку в течение 3–5 сек и центрифугировать в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе.

6.2.6. Полностью удалить надосадочную жидкость.

Подготовленный материал необходимо сразу использовать для выделения ДНК.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из анализируемого материала с использованием комплекта ПРОБА-НК

ВНИМАНИЕ! Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемый комплект для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-НК производства ООО «НПО ДНК-Технология».

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

Необходимо учесть, что для выделения ДНК из каждого образца (включая «К-») потребуется две пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл.

Примечание. В случае выпадения осадка в лизирующем растворе, флакон прогреть при температуре 65°C до полного растворения осадка.

При использовании в качестве анализируемого материала плазмы крови человека выполнить пункт 7.1.1, при использовании иксодового клеща – 7.1.2. Далее в обоих случаях выполнить пункты 7.1.3. – 7.1.14.

7.1.1. Образцы плазмы крови

7.1.1.1. Промаркировать необходимое количество пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-».

7.1.1.2. Внести в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.1.1.3. Добавить в каждую пробирку по 100 мкл образца (кроме пробирки «К-»). В пробирку, промаркированную «К-», добавить 100 мкл физиологического раствора стерильного.

7.1.1.4. Плотно закрыв крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.1.5. Термостатировать пробирки при 65°C в течение 15 мин, осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

7.2.1. Иксодовые клещи

7.2.1.1. В каждую пробирку с подготовленным клещом (п.6.2.5) добавить 100 мкл лизирующего раствора и тщательно растереть с помощью пестика-гомогенизатора (отдельного для каждого образца). В пробирку, маркированную «К-» внести 100 мкл лизирующего раствора.

7.2.1.2. Добавить в каждую пробирку с подготовленным клещом (п.6.2.5) по 300 мкл лизирующего раствора.

7.2.1.3. Плотно закрыть крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.

7.2.1.4. Термостатировать пробирки при 65°C в течение 1 часа.

- 7.2.1.5. Плотно закрыв крышки пробирок, встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек и центрифугировать на микроцентрифуге/вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.2.1.6. Перенести надосадочную жидкость в новые пластиковые пробирки объёмом 1,5 мл.
- 7.2.2. Добавить в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации и встряхнуть пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 7.2.3. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.
- 7.2.4. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).
- 7.2.5. Добавить к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закрыть крышки пробирок и перемешать, аккуратно перевернув пробирки 3–5 раз.
- 7.2.6. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.2.7. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).
- 7.2.8. Добавить к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закрыть крышки пробирок и перемешать, аккуратно перевернув пробирки 3–5 раз.
- 7.2.9. Центрифугировать пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.
- 7.2.10. Не задевая осадок, полностью удалить надосадочную жидкость (отдельным наконечником для каждой пробирки).
- 7.2.11. Открыть крышки пробирок и высушить осадок при 65°C в течение 5 мин.
- 7.2.12. Добавить к осадку по 50 мкл буфера для растворения, закрыть крышки пробирок и термостатировать пробирки при 65°C в течение 10 мин.
- 7.2.13. Осадить конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Препарат ДНК готов для постановки реакции амплификации.

Препарат ДНК можно хранить при минус 20°C не более 6 месяцев или при температуре минус 70°C не более 1 года.

7.3. Проведение полимеразной цепной реакции

7.3.1. Промаркировать необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации с учетом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К–» и для положительного контрольного образца – «К+». При использовании ПЦР-детектора для учета результатов амплификации (формат «FLASH») промаркировать дополнительно 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 пробирку, промаркированную «К–», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, а в пробирку, промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.6. В пробирки, промаркированные «ФОН», не повреждая слой парафина, внести 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

7.3.7. Все пробирки центрифугировать при 1000 об/мин или на микроцентрифуге/вортексе в течение 3–5 сек.

7.3.8. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведенном для амплификаторов с активным регулированием, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Таблица 1

Формат «FLASH». Режим амплификации
для амплификатора Терцик (ООО «НПО ДНК-Технология»)
Алгоритм регулирования: «точный»

№ блока	Для амплификаторов с активным регулированием			Число циклов
	Температура, °С	Время		
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 64,0 67,0	0 0 0	5 5 5	5
3	94,0 64,0 67,0	0 0 0	1 5 5	40
4	10,0	хранение

Таблица 2

Формат «Real-Time». Режим амплификации
для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96
(ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	1	00	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

Формат «Real-Time». Режим амплификации
для детектирующего амплификатора iCycler iQ
(Bio-Rad Laboratories)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	01:00	80,0	
		2	01:30	94,0	
2	5				
		1	00:30	94,0	
		2	00:45	64,0	
3	2				
		1	00:30	80,0	Real Time
Режим амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:45	64,0	Real Time
5		10,0	storage

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

Примечание. При работе с комплектом в формате «FLASH» готовые нормировочные пробирки («ФОН») допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК.

Нормировочные пробирки следует хранить при 2–8°C в течение 1 месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°C), для чего за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР-детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору.

Примечание. Пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75-2,10; для внутреннего контроля – 2,50.

8.2. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96.

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96).

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт результатов реакции с помощью ПЦР-детектора

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

9.1.2. В биологических образцах, содержащих ДНК боррелии бургдорфери, программа фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

9.1.3. В биологических образцах, не содержащих ДНК боррелии бургдорфери, в которых получен положительный результат амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует отрицательный результат.

9.1.4. В случае отрицательного результата на наличие ДНК боррелии бургдорфери и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца, программа фиксирует результат как недостоверный. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца.

9.1.5. При учёте результатов реакции с помощью ПЦР-детектора программа фиксирует сомнительный результат, в случае, если значение для специфики (ДНК боррелии бургдорфери) попадает в зону неопределенности результатов. В этом

случае необходимо повторить исследование данного образца.

- 9.1.6. При получении положительного результата на наличие ДНК боррелии бургдорфери 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 КОМПЛЕКТА

- 10.1.** Срок годности комплекта: формат «FLASH» – 6 мес., формат «Real-time» – 9 мес. с даты изготовления.
- 10.2.** Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК следует хранить в тёмном месте при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.
- 10.3.** Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.4.** Комплекты с истекшим сроком годности применению не подлежат.
- 10.5.** Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению комплекта.
- 10.6.** Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие комплекта требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов БОРРЕЛИО-ГЕН, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, этаж 11, ООО «ДНК-Технология»

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/>

Номер 160-2

27.05.11

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