117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, к.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru

Набор реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления *in vitro* РНК вируса гриппа А субтипа H5N1(«птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) в биологическом материале человека и животных.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа и ротоглотки у человека;
фекалии, внутренние органы, мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки у падших и больных животных.

Выделение РНК:

Комплект реагентов для выделения НК ПРОБА-НК (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности набора:

Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – необходим для оценки качества всех этапов исследования.
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 детектора флуоресцентного (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).
«Real-time» – предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью амплификаторов детектирующих (в качестве альтернативного способа учёта результатов можно использовать метод электрофореза).

Приборное обеспечение:

Формат «Flash»

Термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)
Детектор флуоресцентный «Джин» или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»), версия программного обеспечения не ниже 3.3.

Формат«Real-time»

Амплификатор детектирующий ДТ-322 или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»), версия программного обеспечения не ниже 7.3.
или амплификатор iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories).

Внимание! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании.

Количество определений:

50

Состав набора

Реактив	Количество	
Состав комплекта для проведения обратной транскрипции		
• «Праймеры ОТ-ИнфА + 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, «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)»	20 мкл	50 пробирок
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином, «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)»	20 мкл	50 пробирок
• ПЦР–буфер	500 мкл	2 пробирки
• Taq–полимераза	50 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец («К+») H5	75 мкл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец («К+») N1	75 мкл	1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

Канал детекции	
Fam	**Hex**
Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)	РНК-ВК
Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)	РНК-ВК

Инструкция по применению

1. Выделение РНК

Комплекты для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции должны использоваться только совместно с комплектом для выделения НК (ПРОБА-НК). ДНК-ВК не используется. При выполнении п. 6.1.17. Инструкции по применению комплекта реагентов ПРОБА-НК полученный осадок РНК/ДНК необходимо растворить в 50 мкл буфера для растворения из комплекта ПРОБА-НК.

2. Подготовка и проведение обратной транскрипции

2.1. Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К–» по одной пробирке объёмом 0,5 мл.

2.2. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-ИнфА + дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25°С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

2.3. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
- 2,0 х (N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0 х (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-ИнфА + дНТФ»,
- 0,5 х (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 пробирки 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°С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95°С 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 и отрицательного контрольного образца («К–») по две пробирки с запечатанными парафином смесями для амплификации («Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)»). Для каждого положительного контрольного образца («К+») промаркируйте по одной пробирке с соответствующей запечатанной парафином смесью для амплификации.

Внимание! При использовании для учёта результатов амплификации детектора флуоресцентного (формат «Flash») необходимо промаркировать дополнительно две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации «Вирус гриппа А H5 (Influenza A-H5)» и две пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации «Вирус гриппа А N1 (Influenza A-N1)» (всего четыре нормировочные пробирки «ФОН») для контроля фона флуоресценции.

3.2. Перемешайте ПЦР-буфер и Taq-полимеразу на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

3.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 х (N+1) мкл ПЦР–буфера,
- 0,5 х (N+1) мкл Taq–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 Taq-полимеразой в течение 3–5 сек на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

3.5. Добавьте в каждую пробирку (за исключением пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.

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 рекомендуется вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

3.7. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в пробирки для исследуемых образцов.

3.8. Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирки, маркированные «К–» и «ФОН». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующего положительного контрольного образца в пробирки, маркированные «К+».

3.9. Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (Таблицы 1-3).

Таблица 1. Формат «FLASH»

Программа амплификации для термостата программируемого Терцик.
Алгоритм регулирования – «точный»

№блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов
1	94	1	30	1
2	94	0	5	5
	64	0	5	
	72	0	5	
3	94	0	1	40
	64	0	5	
	72	0	5	
4	10			Хранение

Таблица 2. Формат «Real-time»

Программа амплификации для амплификаторов детектирующих
ДТ-322 и ДТ-96

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

Таблица 3. Формат «Real-time»

Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ.

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	01:30	94,0	
2	5				
		1	00:30	94,0	
		2	00:45	64,0	
3	2				
		1	00:30	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:45	64,0	Real Time
5		…	…	10,0	storage

Примечание. При работе с наборами 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. Нормировочные пробирки следует хранить при 2-8°С в течение 1 месяца в тёмном месте. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18-25°С), поэтому за 1 ч до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

4. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР

4.1. Формат «FLASH». Регистрация и учёт результатов ПЦР проводится с помощью детектора флуоресцентного «Джин» или «Джин-4» согласно инструкции к прибору (пороговые значения для специфичного продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

4.2. Формат «Real–time». Регистрация и учёт результатов проводится на приборах ДТ-322, ДТ-96 или iCycler iQ в соответствии с инструкциями к приборам.

Условия хранения

Комплекты 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 набора: формат «FLASH» – 6 месяцев с даты изготовления, формат «Real-time» – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А субтипа H5N1 («птичьего гриппа») (Influenza A virus subtype H5N1) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (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 рекламаций находится по адресу: http://www.dna-technology.ru/support/

Номер 183-2
16.09.11.