



Служба клиентской поддержки:
8-800-200-75-15 (для России, звонок бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья,
звонок платный).
E-mail: hotline@dna-technology.ru,
www.dna-technology.ru



041 - 14 30.11.2017

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2009/04071 от 23 марта 2017 года

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции ОТ–ГЕПАТОГЕН–С ГЕНОТИП

Каталожные номера:
R4-P604-23/4 (пробирки)
R4-P604-S3/4 (стрипы)

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (Hepatitis C virus) и его генотипирования в образцах плазмы крови методом ОТ-ПЦР.

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С и наиболее распространенных на территории России генотипов HCV (1a, 1b, 2 и 3a/3b) *in vitro*.

Метод:

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

Материал для исследования:

Плазма крови.

Выделение РНК:

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

Особенности набора:

Внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – добавляется в реакционную смесь на стадии выделения РНК, необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3³.

или

iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories).

Время проведения анализа:

5 часов.

Количество определений:

48

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
HCV	РНК-ВК	-	-	-

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительных контрольных образцов, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительные контрольные образцы следует хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

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

Срок годности набора реагентов – 9 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ–ГЕПАТОГЕН–С ГЕНОТИП) следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71.

Служба клиентской поддержки: 8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),
+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на нашем сайте:

http://www.dna-technology.ru/customer_support/

С полной инструкцией № 140-13 от 30.11.17 можно ознакомиться на интернет-сайте компании «ДНК-Технология», по адресу: <http://www.dna-technology.ru/dnaproducts/reagents/med/> или обратитесь за полной инструкцией к представителю компании.

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

Состав набора

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот		
• Лизирующий раствор	15 мл	1 флакон
• Реагент для преципитации	20 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №1	25 мл	1 флакон
• Промывочный раствор №2	15 мл	1 флакон
• Буфер для растворения	1,25 мл	2 пробирки
• Отрицательный контрольный образец	1,5 мл	1 пробирка
• Внутренний контрольный образец (РНК-ВК)	1,0 мл	1 пробирка
Комплект реагентов для обратной транскрипции РНК		
• «ОТ-буфер»	200 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ-НСVтипирование+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 или 6 стрипов по 8 пробирок для каждого генотипа (1a, 1b, 2, 3a/3b) и 48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок «НСV-общий»
• Полимераза ТехноТақ	150 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	1,0 мл	3 пробирки
• Буфер для растворения кДНК	1,25 мл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	6 пробирок
• Положительные контрольные образцы	75 мкл	по 1 пробирке для каждого генотипа (1a, 1b, 2, 3a/3b) и 1 пробирка «НСV-общий»

Проведение анализа

1 Выделение РНК

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации должны использоваться только совместно с комплектом реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК.

1.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца и отрицательного контрольного образца «К-» по одной пробирке объемом 1,5 мл.

1.2 Проведите пробоподготовку согласно полной инструкции к набору реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИП.

2 Подготовка и проведение обратной транскрипции

2.1 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-НСVтипирование+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), затем встряхните на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Примечание - В случае выпадения осадка в буферном растворе «ОТ-буфер» пробирку следует оставить при комнатной температуре до полного растворения осадка, периодически встряхивая на вортексе.

2.2 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-НСVтипирование+дНТФ»;
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 - количество промаркированных пробирок с учётом «К-».

Например, необходимо проанализировать 10 образцов. Промаркированных пробирок – 11. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 12 (11+1) пробирок, т.е. 24 мкл ОТ-буфера + 12 мкл праймеров + 6 мкл обратной транскриптазы.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

2.3 Встряхните пробирку с ОТ-смесью на вортексе и центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

2.4 Добавьте по 3,5 мкл ОТ-смеси в пробирки с 16,5 мкл выделенной РНК и в пробирку «К-». Перемешайте пипетированием 5-7 раз.

2.5 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при температуре 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при температуре 95 °С в течение 5 мин.

Примечание - Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

2.6 Осадите капли центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре.

2.7 К полученной кДНК добавьте 10 мкл буфера для растворения кДНК.

2.8 Встряхните пробирки на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с при комнатной температуре.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечания

1. Допускается хранение кДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.
2. Для генотипирования вируса гепатита С (НСV) можно использовать кДНК, полученную при работе с наборами реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С и ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ (ООО «НПО ДНК-Технология»). В этом случае перед постановкой ПЦР-амплификации необходимо выполнить подпункты 2.7 - 2.8 («Подготовка и проведение обратной транскрипции»).

Изучите полную инструкцию № 140-13 от 30.11.17 перед началом работы

3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 3.1** Разморозьте при комнатной температуре ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации.
- 3.2** Промаркируйте по одной пробирке из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1а тип, 1в тип, 2 тип, 3а/3б тип и «HCV-общий») для каждого исследуемого образца, положительного контрольного образца (K+) и отрицательного контрольного образца (K-).
Например, необходимо проанализировать 5 образцов по 4 генотипам HCV. Нужно промаркировать 25 пробирок для исследуемых образцов, 5 пробирок для «K-» и 5 пробирок для «K+». Общее количество пробирок – 35.
- 3.3** Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq на вортексе в течение 3-5 с, затем центрифугируйте при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.
ВНИМАНИЕ! Полимеразу ТехноТaq необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 3.4** Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера;
 - 0,5 x (N+1) мкл полимеразы ТехноТaq,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «K-» и «K+».
Например, необходимо проанализировать 5 образцов, «K-» и «K+». Промаркированных пробирок – 35. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq для 36 (35+1) пробирок, т.е. 360 мкл ПЦР-буфера + 18 мкл полимеразы ТехноТaq.
- 3.5** Перемешайте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.
ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq можно хранить при температуре от 2 °C до 8 °C не более одного часа.
- 3.6** Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq.
- 3.7** Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 3.8** Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить кончиком с фильтром.
Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов (5 шт. для каждого образца). В пробирки «K-», «K+» кДНК не вносится.
- 3.9** Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирки, маркированные «K-». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл соответствующих положительных контрольных образцов в пробирки, маркированные «K+».
- 3.10** Центрифугируйте пробирки при 1000-3000 об/мин в течение 3-5 с при комнатной температуре.
- 3.11** Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.

Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HCV.tpr.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «HCV.tpr», укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (3.11) и проведите ПЦР.

Для приборов iQ, iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler (или Bio-Rad iQ5). При первой постановке создайте и сохраните новый протокол. При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 1, 2).

Таблица 1 - 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	00:30	80,0	
		2	05:00	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

Изучите полную инструкцию № 140-13 от 30.11.17 перед началом работы

Таблица 2 - Программа амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

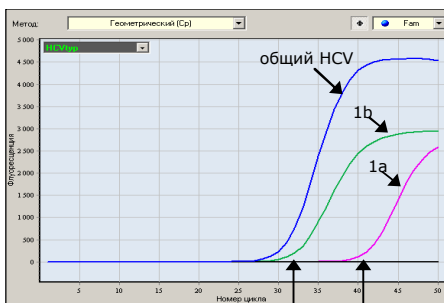
Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo					
1	1	1	05:00	94,0	
2	50	1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
3	1	1	01:00	10,0	

4 **Регистрация и учет результатов ПЦР** проводится автоматическим программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 3.

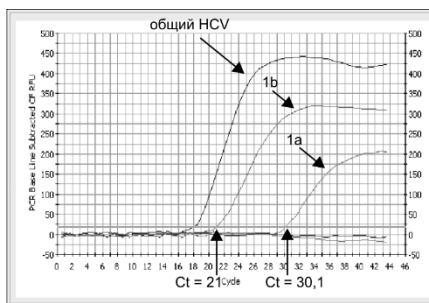
Таблица 3 - Интерпретация результатов ПЦР

Результат по каналу детекции FAM		Результат по каналу детекции HEX		Интерпретация результата исследования
Один из генотипов HCV (1a, 1b, 2, 3a/3b)	HCV-общий	Внутренний контроль		
Анализируемые образцы				
Cp(Ct)<40 ⁴	Cp(Ct)<40 ⁴	Не учитывается		Обнаружена РНК вируса гепатита С _____ генотипа
Cp(Ct) не указан	Cp(Ct) не указан	Cp(Ct)≤36 ⁴		РНК вируса гепатита С не обнаружена
Cp(Ct) не указан	Cp(Ct)<40 ⁴	Не учитывается		Обнаружена РНК вируса гепатита С, тип не идентифицирован ⁵
Cp(Ct) не указан	Cp(Ct) не указан	Cp(Ct) не указан или Cp(Ct)>36 ⁴		Результат недостоверный
Положительный контрольный образец⁶				
Cp(Ct)≤33	Cp(Ct)≤33	Не учитывается		Положительный результат
Отрицательный контрольный образец⁶				
Cp(Ct) не указан	Cp(Ct) не указан	Cp(Ct)≤36		Отрицательный результат

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



А)



Б)

Р и с у н о к 1 - Интерпретация: выявлен генотип 1b

А – для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96
Б – для приборов iCycler iQ и iQ5

⁴ - если значения Cp(Ct) по каналу FAM превышают 40 или значения по FAM не указаны, а по каналу HEX Cp(Ct)>36, необходимо повторить проверку, начиная с этапа выделения РНК.

⁵ - 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, предложенные в данном наборе, может свидетельствовать о наличии других вариантов HCV в исследуемом образце (например, генотипы 4, 5 и 6).

⁶ - если значения Cp(Ct) превышают указанные, результат исследования недостоверный.