



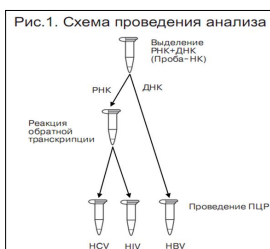
Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР–амплификации кДНК HCV, HIV и ПЦР–амплификации ДНК HBV

Информация о комплектах

Назначение:

Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР–амплификации кДНК HCV, HIV и ПЦР–амплификации ДНК HBV предназначены для проведения исследований на выявление РНК вируса гепатита С (HCV) и вируса иммунодефицита человека (HIV) в образцах плазмы крови методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ–ПЦР) для комплектов реагентов HCV и HIV, и ДНК вируса гепатита В (HBV) в образцах плазмы крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для комплекта реагентов HBV. Исследование состоит из следующих этапов:

1. Выделение РНК/ДНК: проводится с использованием комплекта реагентов ПРОБА–НК, укомплектованного двумя внутренними контролями РНК–ВК и ДНК–ВК.
2. Постановка обратной транскрипции: выполняется с использованием комплекта реагентов «ОТ–MIX», содержащего ОТ–праймеры для HAV, HCV, HDV, HGV и HIV.
3. ПЦР: проводится с комплектами реагентов, специфичными для каждой инфекции.
4. Детекция: осуществляется в зависимости от формата комплекта реагентов ПЦР. В зависимости от способа детекции результатов амплификации комплекты реагентов выпускаются в трех форматах (таблица 1).



Т а б л и ц а 1 - Форматы комплектов реагентов

	Регистрационное удостоверение	Форез	Flash	Real-time
HBV	№ ФСР 2008/03507 от 25 июля 2016 года	+	+	+
HCV	№ ФСР 2008/03892 от 15 ноября 2016 года	+	+	+
HIV	№ ФСР 2008/03504 от 26 апреля 2010 года	-	+	+

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; качественный анализ (для комплектов реагентов HCV и HIV).

Полимеразная цепная реакция; качественный анализ (для комплекта реагентов HBV).

Материал для исследования:

Плазма крови.

Особенности комплектов:

Внутренний контрольный образец (РНК-ВК и ДНК-ВК) – необходим для оценки эффективности всех этапов исследования.

Приборное обеспечение:

Формат «Форез»: Термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Формат «Flash»: Термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»); детектор флуоресцентный «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 3.3, рекомендуемая версия 4.4.0.10; или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 4.4.0.8, рекомендуемая версия 4.4.0.10.

Формат «Real-time»: Амплификаторы детектирующие ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3.4.0³.
или амплификаторы iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories).

Время проведения анализа (с учётом пробоподготовки):

4 часа.

Количество определений:

100⁴/96⁵

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/>

⁴ - для формата «Flash» и «Форез».

⁵ - для формата «Real-time».

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Состав комплектов:

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для обратной транскрипции «ОТ–МIX»⁶		
• Буферный раствор «ОТ–буфер»	200 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» ⁷	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	50 мкл	1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР–амплификации		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином ⁸	20 мкл	100 пробирок ⁹ для формата «Flash» и «Форез», 96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок для формата «Real-time»
• ПЦР–буфер	500 мкл	2 пробирки
• Полимераза ТехноТаq	50 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец ⁸	150 мкл	1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Специфический продукт	РНК-ВК/ДНК-ВК	-	-	-

Проведение анализа

1 Выделение РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов ПРОБА–НК

В состав комплекта ПРОБА–НК входят два внутренних контрольных образца РНК–ВК и ДНК–ВК, которые добавляются в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот, что позволяет оценить качество всех этапов исследования.

- При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК–содержащими вирусами (HCV и HIV) и ДНК–содержащими вирусами (HBV) необходимо на стадии пробоподготовки внести два внутренних контроля (РНК–ВК + ДНК–ВК).
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных РНК–содержащими вирусами (HCV и HIV) необходимо внести внутренний контроль РНК–ВК.
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных ДНК–содержащими вирусами (HBV) необходимо внести внутренний контроль ДНК–ВК.

Выделение РНК/ДНК для комплектов реагентов HBV, HCV и HIV производится в соответствии с полными инструкциями для соответствующих наборов реагентов.

При выполнении пункта 6.17 инструкции по применению комплекта реагентов ПРОБА–НК полученный осадок НК растворяется в 25 мкл буфера для растворения из комплекта ПРОБА–НК. Для проведения обратной транскрипции необходимо использовать 16,5 мкл препарата НК.

Для ПЦР–амплификации ДНК гепатита В необходимо использовать 5,0 мкл из оставшегося объёма препарата НК.

2 Подготовка и проведение обратной транскрипции

- Разморозьте содержимое пробирок «ОТ–буфер» и «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 с и центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 1–3 с.
- Приготовьте ОТ–смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 2,0x(N+1) мкл ОТ–буфера;
 - 1,0x(N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ»;
 - 0,5x(N+1) мкл обратной транскриптазы,
 где N – количество анализируемых образцов с учётом «К–».
- Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 с.
- Добавьте по 3,5 мкл ОТ–смеси в пробирки с 16,5 мкл выделенной РНК/ДНК и в пробирку «К–». Перемешайте пипетированием 5–7 раз.
- Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.
- Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13 000 об/мин в течение 30 с. Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР. При необходимости допускается хранение кДНК при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более одного месяца.

⁶ - только для комплектов реагентов HCV и HIV.

⁷ - «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ» представляет собой универсальную ОТ–смесь, которая может быть использована для постановки реакции обратной транскрипции РНК HAV, HCV, HDV, HGV и HIV.

⁸ - смесь для амплификации, запечатанная парафином, и положительный контрольный образец являются специфичными для каждой инфекции. Обращайте внимание на маркировку пакетов и пробирок!

⁹ - комплекты реагентов для ПЦР–амплификации в зависимости от наименования выпускаются в пробирках 0,5 и 0,2 мл.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

3.1 Промаркируйте для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+) по одной пробирке с 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 (две нормировочные пробирки «ФОН») для контроля фона флуоресценции.

3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq, затем центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вortexе.

3.3 Приготовьте смесь ПЦР-буфера с полимеразой ТехноТaq. Смешайте в отдельной пробирке:

- 10x(N+1) мкл ПЦР-буфера;
- 0,5x(N+1) мкл полимеразы ТехноТaq,

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+».

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

3.5 Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

3.6 Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК/ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты кДНК/ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.

Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл полученного из исследуемых образцов и предварительно перемешанного препарата кДНК/ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.

3.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл предварительно перемешанного отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирки, маркированные «К-» и «ФОН». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл предварительно перемешанного положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».

3.8 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вortexе в течение 1–3 с.

3.9 Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый.

3.10 Форматы «Форез» и «Flash».

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Алгоритм регулирования «Быстрый» (таблица 3).

3.11 Формат «Real-time».

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

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием (HBV_HCV.ini или HIV.ini). Далее и при последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест (HBV_HCV или HIV), укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (3.9) 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 первом проведении ПЦР создайте и сохраните новый протокол. При последующих постановках выберите сохранённый 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 4, 5).

4 Регистрция и учёт результатов ПЦР.

Формат «Форез»: результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. таблицу 2 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

Формат «Flash»: с помощью ПЦР-детектора «Джин», «Джин-4» согласно инструкции к прибору.

Формат «Real-time»: на приборах ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96, или iCycler iQ, iQ5 согласно инструкциям к приборам.

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, за исключением 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. Допускается многократное замораживание/оттаивание ПЦР-буфера и минерального масла.

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

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

Срок годности комплектов – 9 месяцев (для комплектов реагентов HCV и HIV) и 12 месяцев (для комплекта реагентов HBV) при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК HCV, HIV и ПЦР-амплификации ДНК HBV, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

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

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

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

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

Т а б л и ц а 2 - Длины продуктов ПЦР-амплификации (пар нуклеотидов)

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации	Длина внутреннего контроля
Вирус гепатита В (HBV)	295	560
Вирус гепатита С (HCV)	253	480
Вирус иммунодефицита человека (HIV)	223	480

Т а б л и ц а 3 - Форматы «Форез» и «Flash»

№ блока	HBV, HCV		HIV				Число циклов
	Для амплификаторов с активным регулированием						
	Температура, °C	Время		Температура, °C	Время		
мин		с	мин		с		
1	94,0	5	00	94,0	5	00	1
2	94,0	0	10	94,0	0	10	50
	62,0	0	20	58,0	0	25	
				64,0	0	15	
3	10,0	10,0	хранение

Т а б л и ц а 4 - Режим амплификации для iCycler IQ (Формат «Real-time»)

Cycle	HBV, HCV				HIV				PCR/Melt Data Acquisition
	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.									
1	1				1				
		1	00:30	80,0		1	00:30	80,0	
		2	05:00	94,0		2	05:00	94,0	
2	5				10				
		1	00:20	94,0		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0		2	00:20	58,0	
						3	00:10	64,0	
3	2				2				
		1	00:20	80,0		1	00:20	85,0	Real Time
Программа амплификации									
4	45				40				
		1	00:10	94,0		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0		2	00:10	58,0	
						3	00:30	58,0	Real Time
						4	00:20	64,0	
5		10,0		10,0	storage

Т а б л и ц а 5 - Программа амплификации для iCycler IQ5 (при использовании Persistent Well Factor) (Формат «Real-time»)

Cycle	HBV, HCV				HIV				PCR/Melt Data Acquisition
	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	
1	1				1				
		1	05:00	94,0		1	05:00	94,0	
2	50				50				
		1	00:10	94,0		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0		2	00:25	58,0	Real Time
						3	00:15	64,0	
3	1				1				
		10,0		10,0	storage

Примечание - Для наборов «ОТ-Гепатоген-С», «ВГБ-ГЕН», «ОТ-Гепатоген-С количественный», «Гепатоген-Б количественный», «ОТ-Гепатоген-С ГЕНОТИП» в формате «Real-time» используется единая программа амплификации.