



В данном вкладыше приведена информация для комплекта реагентов КВМ.

Изучите полную инструкцию № 156-6 от 31.08.2018 перед началом работы. Ознакомьтесь с текстом инструкции № 156-6 от 31.08.2018 по применению комплекта реагентов КВМ на интернет-сайте компании «ДНК-Технология» по адресу: <http://www.dna-technology.ru/dnaproducts/reagents/med/> или обратитесь за ней к представителю компании.

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени

КВМ

Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2010/08412 от 22 ноября 2016 года

Каталожные номера:

R1-P805-23/9 (пробирки, 96 определений)

R1-P805-S3/9 (стрипы, 96 определений)

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов КВМ предназначен для определения и приблизительной оценки количества геномной ДНК человека в биологическом материале.

Комплект рекомендуется использовать:

- для исключения ошибок преаналитического этапа при исследовании биологического материала, содержащего клетки эпителия человека (контроль взятия материала врачом-клиницистом (КВМ));
- для оценки количества геномной ДНК человека.

Метод:

Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени.

Материал для исследования:

Соскобы из уретры, цервикального канала, с заднего свода влагалища, конъюнктивы глаза, задней стенки носоглотки и других слизистых, клеточный осадок мочи, кровь и др.

Выделение ДНК:

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Специализированное оборудование:

Амплификаторы детектирующие ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3³ или амплификатор iCycler iQ5 (Bio-Rad Laboratories).

Внимание! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».

Количество исследуемых образцов:

96 (включая один положительный и один отрицательный контрольный образец в каждой постановке).

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

2 часа.

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»: <https://www.dna-technology.ru/poequip/po-dlya-oborudovaniya>

Состав комплекта:

Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная жидкость	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл в пробирке
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	150 мкл
Крышки для стрипов*	12 шт.		

* - входят в состав комплекта реагентов при расфасовке смеси для амплификации в стрипы

Т а б л и ц а 1 - Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
KBM	BK	-	-	-

Проведение анализа

1 Выделение ДНК

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения нуклеиновых кислот из биологического материала: ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ГС-ПЛЮС, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, ПРОБА-НК, ПРОБА-НК-ПЛЮС.

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

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать стерильный физиологический раствор или транспортную среду для биопроб в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 2.1 Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+).
Например, необходимо проанализировать четыре образца. Нужно промаркировать четыре пробирки для исследуемых образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок - шесть.
- 2.2 Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 2.3 Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.
- 2.4 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 2.5 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать её перед внесением следующего. Образцы следует вносить наконечниками с фильтром.
Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 2.6 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 2.7 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 3–5 сек.

2.8 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.

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

Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР создайте и сохраните новый тест. Далее и при последующих постановках добавьте в протокол сохраненный тест, укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (2.8) и проведите ПЦР (таблица 2).

2.10 Для прибора iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 мин. Запустите программное обеспечение 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 (таблица 3).

Таблица 2 - Программа амплификации для детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

№ блока	Температура, °C	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	94	0	5	1		цикл
5	10			хранение		хранение

Таблица 3 - Программа амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
1	1	1	1:00	80,0	
		2	1:30	94,0	
2	5	1	0:30	94,0	
		2	0:45	64,0	
3	45	1	0:10	94,0	
		2	0:45	64,0	Real-time storage
4		10,0	

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов свяжитесь с представителем компании «ДНК-Технология» для уточнения программы амплификации.

3 Регистрация и учёт результатов ПЦР

Детекция и учёт результатов осуществляется на приборах ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 или iCycler iQ5 в соответствии с инструкциями к приборам.

Интерпретация результатов проводится с учётом значений C_p по каналу спецификации (канал Fam) и внутреннего контроля (канал Hex) в соответствии с таблицами 4 и 5.

Т а б л и ц а 4 - Интерпретация результатов при использовании детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

Результат по каналу Fam, Cp	Результат по каналу Hex, Cp	Интерпретация	Количество геномной ДНК на реакцию, нг
менее 23	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
23 – 32	не учитывается		750–1,0
32–38	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением генотипирования!)	1,0–0,01
более 38	27 – 32	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 38	более 32	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	27 – 32	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	–
не определяется	не определяется или более 32	Результат недостоверный	–

Т а б л и ц а 5 - Интерпретация результатов при использовании амплификатора iCycler IQ5

Результат по каналу Fam, Cp	Результат по каналу Hex, Cp	Интерпретация	Количество геномной ДНК на реакцию, нг
менее 18	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве	более 750
18–27	не учитывается		750–1,0
27–33	не учитывается	ДНК человека в препарате ДНК присутствует в достаточном для анализа количестве (за исключением генотипирования!)	1,0–0,01
более 33	22 – 27	ДНК человека присутствует в недостаточном для анализа количестве	менее 0,01
более 33	более 27	Возможно, в препарате ДНК присутствуют ингибиторы ПЦР	менее 0,01
не определяется	22 – 27	ДНК человека отсутствует или присутствует в следовых количествах	–
не определяется	не определяется или более 27	Результат недостоверный	–

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование комплекта осуществляют всеми видами крытого транспорта при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности комплекта.

Комплект следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности комплекта.

П р и м е ч а н и е - Допускается транспортирование при температуре от 0 °С до 24 °С не более 72 часов.

Срок годности комплекта – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ), 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