



Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2011/12014

117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15
(звонок по России бесплатный)
E-mail: hotline@dna-technology.ru,
www.dna-technology.ru

Набор реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А (Influenza A) и гриппа В (Influenza B) методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени ГриппКомплекс

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А и В с детекцией в режиме реального времени Influenza A&B virus

Информация о комплекте

Назначение:

Комплект реагентов Influenza A&B virus предназначен для выявления РНК возбудителей гриппа А (Influenza A) и гриппа В (Influenza B) в биологическом материале человека и животных.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа, ротоглотки, трахеи, бронхоальвеолярный лаваж, биоптаты внутренних органов.

Выделение РНК:

Рекомендуется комплекты реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА-НК, ПРОБА-МЧ-НК-200 (ООО «НПО ДНК-Технология»).

Особенности набора:

Одновременная детекция (мультиплексный анализ) – в одной пробирке определяются несколько ДНК-мишеней.

Внутренний контрольный образец (ВК) – необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.5.5.23, рекомендуемая версия 7.7.5.42³.

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

от 2,5 часов.

Количество определений:

48

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

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

³ – по мере обновления программного обеспечения рекомендуемая версия ПО может измениться. Последнюю рекомендуемую версию ПО можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/po/>

Состав комплекта:

Реактив	Количество	
Состав комплекта для проведения обратной транскрипции		
• Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ	50 мкл	1 пробирка
• ОТ-буфер	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Состав комплекта для ПЦР-амплификации		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок
• Taq-полимераза	25 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	500 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец	75 мкл	1 пробирка
• Крышки для стрипов		6 шт.

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza A virus	BK	Influenza B virus	-	-

Проведение анализа

1 Выделение РНК

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

1.2 Проведите пробоподготовку согласно инструкции к соответствующему комплекту для выделения НК (ПРОБА-НК, ПРОБА-МЧ-НК-200).
Осадок после сушки следует растворять в 50 мкл буфера для растворения. ДНК-БК и РНК-БК не используются.

Примечание. Полученный препарат РНК не подлежит хранению, его необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции.

2 Подготовка и проведение обратной транскрипции

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

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

2.3 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0 x (N+1) мкл праймеров ОТ-RANDOM + дНТФ,
- 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,

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

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Промаркированных пробирок — 6. Нужно приготовить смесь ОТ-буфера, праймеров и обратной транскриптазы для 7 (6+1) пробирок, т.е. 14 мкл ОТ-буфера + 7 мкл праймеров + 3,5 мкл обратной транскриптазы.

Внимание! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

2.4 Встряхните пробирку с ОТ-смесью 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.

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы РНК наконечниками с аэрозольными барьерами.

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

Изучите полную инструкцию перед началом работы

- 2.9** Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.
- Примечание.** Рекомендуется использовать программируемые термостаты с прижимной крышкой (например, «Гном» производства ООО «НПО ДНК-Технология»)
- 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 по одной пробирке со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К-») и положительного контрольного образца («К+»).
- Например, необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать 2 пробирки для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 4.
- 3.2** Разморозьте содержимое пробирки с ПЦР-буфером при комнатной температуре. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Таq-полимеразой в течение 3–5 сек, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Таq-полимеразу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 3.3** Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Таq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 × (N+1) мкл Таq-полимеразы,
- где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-» и «К+».
- 3.4** Встряхните пробирку в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- Внимание!** Смесь ПЦР-буфера и Таq-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение двух часов после приготовления.
- 3.5** Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Таq-полимеразы.
- 3.6** Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 3.7** Для предотвращения контаминации следует перед внесением кДНК открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с фильтром.
- Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов.
- 3.8** Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения РНК и обратную транскрипцию, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 3.9** Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 3.10** Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
- 3.11** Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «InflAB.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «InflAB», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (см. 3.10) и проведите ПЦР.
- 4** **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов. Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 1.

Условия хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок или стрипов с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительного контрольного образца, следует хранить при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается многократное замораживание ПЦР-буфера и минерального масла.

Пробирки или стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительный контрольный образец следует хранить в тёмном месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 9 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А и В с детекцией в режиме реального времени (Influenza A&B virus) следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, корп.6, тел./факс +7 (495) 980-45-55, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

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

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

Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox		
Анализируемые образцы				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	-	РНК возбудителей не обнаружена
Ср указан	Не учитывается	Ср не указан	+	Обнаружена РНК вируса гриппа А (Influenza А)
Ср не указан	Не учитывается	Ср указан	+	Обнаружена РНК вируса гриппа В (Influenza В)
Ср указан	Не учитывается	Ср указан	+	Обнаружена РНК вирусов гриппа А, В (Influenza А, В)
Ср не указан	Ср не указан	Ср не указан	нд	Результат недостоверный ⁴
Положительный контрольный образец				
Ср указан	Не учитывается	Ср указан	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан	Ср указан	Ср не указан	-	Результат отрицательный

⁴ - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение РНК для данного образца, выполняется последовательно.