



Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2011/12016

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 НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

ОРЗ ВирусКомплекс

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов ОРЗ ВирусКомплекс предназначен для выявления НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека в биологическом материале человека *in vitro*.

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 и ротоглотки.

Выделение НК:

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

Особенности набора:

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

Внутренний контрольный образец (ВК) – присутствует в каждой пробирке с амплификационной смесью, 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.

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

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

2,5 часа.

Количество определений:

24

Состав набора:

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		
• Смес для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	24 стрипа по 8 пробирок
• Таq-полимераза	50 мкл	2 пробирки
• ПЦР-буфер	500 мкл	4 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	4 пробирки
• Положительный контрольный образец	160 мкл	1 пробирка
Крышки для стрипов		24 шт.

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/>

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Состав стрипов, цветовая маркировка и каналы детекции продуктов амплификации

№ пробирки	Канал детекции			Цветовая маркировка буфера
	Fam	Hex	Rox	
1	Human respiratory syncytial virus	BK	-	Голубой
2	Human coronavirus OC43	BK	Human parainfluenza virus type 3	Бесцветный
3	Human parainfluenza virus type 2	BK	Human coronavirus 229E	
4	Human parainfluenza virus type 1	BK	Human coronavirus NL63	
5	Human parainfluenza virus type 4	BK	Human coronavirus HKU 1	
6	Human rhinovirus	BK	-	
7	Human adenovirus	BK	-	
8	Human metapneumovirus	BK	-	

Проведение анализа

1 Выделение НК

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

1.2 Проведите пробоподготовку согласно инструкции к комплекту для выделения НК (ПРОБА-НК). При использовании комплекта реагентов ПРОБА-НК осадок после сушки следует растворять в 35 мкл буфера для растворения. ДНК-ВК и РНК-ВК не используются.

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

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-RANDOM + дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (от 18 °С до 25 °С), 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:

- 4,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера,
- 2,0 x (N+1) мкл праймеров ОТ-RANDOM + дНТФ,
- 1,0 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. 28 мкл ОТ-буфера + 14 мкл праймеров + 7 мкл обратной транскриптазы.

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

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 7,0 мкл ОТ-смеси.

2.6 Внесите в пробирки с ОТ-смесью по 33 мкл соответствующего образца НК, используя отдельные наконечники для каждого образца. В пробирку «К-» НК не вносится.

2.7 В пробирку, маркированную «К-», внесите 33 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК.

Примечание. Во избежание контаминации рекомендуется вносить образцы НК 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.

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.

2.11 Добавьте к полученному препарату ДНК 15 мкл буфера для растворения из состава комплекта ПРОБА-НК. Встряхните пробирки на вортексе в течение 3-5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

Полученный препарат ДНК готов для проведения ПЦР.

3 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

3.1 Промаркируйте по одному стрипу со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, для положительного контрольного образца («К+») и для отрицательного контрольного образца («К-»).

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Примечание. Стрип рассчитан на исследование одного образца.

Например, необходимо проанализировать два образца. Нужно промаркировать 2 стрипа для исследуемых образцов, один для «К-» и один для «К+». Общее количество стрипов – 4 (таблица 1).

Таблица 1

Маркировка пробирок для проведения ПЦР

Образец 1	Стрип 1
Образец 2	Стрип 2
«К-»	Стрип 3
«К+»	Стрип 4

- 3.2** Разморозьте содержимое пробирки с ПЦР-буфером при комнатной температуре. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
Внимание! Taq-полимеразу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 3.3** Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
- 10 × (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 × (N+1) мкл Taq-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 Taq-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием, она должна быть использована в течение двух часов после приготовления.
- 3.5** Добавьте в каждую пробирку стрипов, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-полимеразы.
- 3.6** Добавьте в каждую пробирку стрипов по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки стрипов.
- 3.7** Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышку только того стрипа, в который будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с фильтром.
Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата ДНК в соответствующие стрипованные пробирки для исследуемых образцов. В стрипы «К-», «К+» ДНК не вносится.
- 3.8** Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и реакцию обратной транскрипции, в стрипованные пробирки, маркированные «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в стрипованные пробирки, маркированные «К+».
- 3.9** Центрифугируйте стрипы на микроцентрифуге/вортексе в течение 1-3 сек.
- 3.10** Установите все стрипы в блок детектирующего амплификатора.
- 3.11** Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «ORZ_VirusComplex.ini». Далее и при последующих постановках добавьте в протокол тест «ORZ_VirusComplex», укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе положительного и отрицательного контрольных образцов, отметьте расположение стрипов 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 2.

Условия хранения и эксплуатации

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме 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.

Стрипы с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительный контрольный образец следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов для выявления НК возбудителей острых респираторных вирусных инфекций человека методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (ОРЗ ВирусКомплекс), 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

Изучите полную инструкцию перед началом работы

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/

Таблица 2

Интерпретация результатов ПЦР				
Выбранный флуорофор			Результат	Интерпретация результата
Fam	Hex	Rox		
Анализируемые образцы				
Ср указан (для одной или нескольких пробирок)	Не учитывается	Ср указан (для одной или нескольких пробирок №2-5)	+	Обнаружена НК одного или нескольких возбудителей
Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	Ср указан (для тех же пробирок, что и по каналу Fam\Rox)	Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	-	НК определяемых возбудителей не обнаружена
Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	Ср не указан (для тех же пробирок, что и по каналу Fam\Rox)	Ср не указан (для одной или нескольких пробирок)	нд	Результат недостоверный*
Положительный контрольный образец				
Ср указан (для всех пробирок)	Ср указан (для всех пробирок)	Ср указан (для пробирок №2-5)	+	Результат положительный
Отрицательный контрольный образец				
Ср не указан (для всех пробирок)	Ср указан (для всех пробирок)	Ср не указан (для всех пробирок)	-	Результат отрицательный

* - требуется перестановка ПЦР или повторное выделение НК для данного образца, выполняется последовательно.