

Только для научно-исследовательских целей

Набор реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с детекцией методом гель-электрофореза

Информация о наборе

Назначение:

Набор реагентов предназначен для качественного определения вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования в образцах плазмы крови методом ОТ-ПЦР. Набор может быть использован в диагностике наиболее распространенных в России генотипов HCV (1a, 1b, 2a, 2b и 3).

Метод:

Полимеразная цепная реакция, качественный анализ; детекция методом гель-электрофореза.

Материал для исследования:

Плазма крови.

Выделение ДНК:

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

Особенности комплектов:

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

Приборное обеспечение:

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

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

Количество определений: 50

Состав набора:

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для обратной транскрипции		
• «ОТ-буфер»	100 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ-типирование HCV+дНТФ»	50 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	по 50 пробирок для каждого генотипа (1a, 2a, 1b, 2b, 3) и 50 пробирок «HCV-общий»
• Полимераза ТехноТақ	150 мкл	1 пробирка
• ПЦР-буфер	1,0 мл	3 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	6 пробирок
• Буфер для растворения	1,25 мл	1 пробирка
• Положительные контрольные образцы («К+»)	75 мкл	6 пробирок (по 1 пробирке для каждого генотипа (1a, 2a, 1b, 2b, 3) и 1 пробирка «HCV-общий»)

Инструкция по применению

1. Выделение РНК

Комплекты для обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции должны использоваться только совместно с комплектом для выделения НК (ПРОБА-НК). ДНК-ВК не используется.

- 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).

2. Подготовка и проведение обратной транскрипции

- 2.1 Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-типирование HCV + дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при комнатной температуре (18–25 °С), затем встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек.

- 2.2 Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:

- 2,0 x (N+1) мкл ОТ-буфера,
- 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-типирование HCV + 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.

- 2.3 Встряхните пробирку на вортексе и центрифугируйте при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.4 Добавьте в пробирки с выделенной РНК и отрицательным контрольным образцом по 3,5 мкл ОТ-смеси, используя отдельные наконечники для каждого образца, перемешайте пипетированием 5–7 раз.
- 2.5 Поместите пробирки в термостат и инкубируйте при 40 °С в течение 30 мин, затем прогрейте при 95 °С в течение 5 мин.
- 2.6 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.
- 2.7 К 20 мкл кДНК добавьте 20 мкл буфера для растворения.
- 2.8 Встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек.
- 2.9 Осадите капли со стенок пробирок центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.

Полученный препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

3. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

- 3.1 Промаркируйте по одной пробирке из каждого комплекта со смесью для амплификации, запечатанной парафином (1a, 2a, 1b, 2b, 3 тип и «HCV-общий») для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К-») и положительного контрольного образца («К+»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов по 5 генотипам HCV. Нужно промаркировать 30 пробирок для исследуемых образцов, 6 пробирок для «К-» и 6 пробирок для «К+». Общее количество пробирок – 42.

	1a тип	1b тип	2a тип	2b тип	3 тип	HCV-общий
Образец 1	√	√	√	√	√	√
Образец 2	√	√	√	√	√	√
Образец 3	√	√	√	√	√	√
Образец 4	√	√	√	√	√	√
Образец 5	√	√	√	√	√	√
«К-»	√	√	√	√	√	√
«К+»	√	√	√	√	√	√

- 3.2 Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и полимеразой ТехноТaq и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 3.3 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 «К–» и «К+».
- Например, необходимо проанализировать 5 образцов, «К–» и «К+». Промаркированных пробирок – 42. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq для 43 (42+1) пробирок, т.е. 430 мкл ПЦР-буфера + 21,5 мкл полимеразы ТехноТaq .
- 3.4 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и полимеразы ТехноТaq .
- 3.5 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 3.6 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 наконечниками с аэрозольным барьером.
- Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов и предварительно перемешанного препарата кДНК (6 шт. для каждого образца).
- 3.7 Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл предварительно перемешанного отрицательного контрольного образца, прошедшего этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирку, маркированную «К–». Внесите, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл предварительно перемешанного положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 3.8 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1-3 сек.
- 3.9 Установите все пробирки в прибор и проведите ПЦР в режиме, приведенном в таблицах, с учетом объема реакционной смеси 35 мкл.

Примечание: При использовании «Терцик» необходимо выбрать алгоритм регулирования «Точный».

Таблица 1

Режим амплификации

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	5	00	94,0	5	00	1
2	94,0	0	20	94,0	0	50	5
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	20	
3	94,0	0	5	94,0	0	20	40
	64,0	0	5	64,0	0	20	
	72,0	0	5	72,0	0	20	
4	10,0	10,0	Хранение

4. Регистрация и учет результатов ПЦР

По окончании реакции амплификации результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. инструкцию к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза).

Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета. Длины продуктов амплификации представлены в таблице 2.

Необходимо учитывать, что для вируса гепатита С характерен высокий полиморфизм, обуславливающий большое разнообразие генотипов, субтипов и вариаций. Помимо предложенных в данном наборе могут встречаться другие генотипы (2с, 2i, 4, 5, 6 и т.д.). Одним из критериев получения достоверного результата является выявление РНК вируса

гепатита С, которое при отсутствии положительных результатов с генотипирующими праймерами свидетельствует о наличии редкого генотипа (таблица 3).

Таблица 2

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, п.н.
HCV	153
Генотип HCV 1a	278
Генотип HCV 1b	215
Генотип HCV 2a	262
Генотип HCV 2b	371
Генотип HCV 3	212
Внутренний контроль	900

Таблица 3

Интерпретация результатов ПЦР

Наличие продукта амплификации			Интерпретация результата исследования
Один из генотипов HCV (1a, 1b, 2a, 2b, 3)	«HCV-общий»	Внутренний контроль	
+	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С _____ генотипа
-	-	+	РНК вируса гепатита С не обнаружена
-	-	-	Результат недостоверный
-	+	Не учитывается	Обнаружена РНК вируса гепатита С, тип не идентифицирован

Пустая дорожка геля (отсутствуют полосы внутреннего контроля и специфического фрагмента) свидетельствует о том, что реакция амплификации не прошла. Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате РНК/ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала.

В случае наличия полосы ДНК, соответствующей фрагменту ДНК определённого генотипа HCV, в отрицательных контрольных образцах результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Условия 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 минус 20 °С в течение всего срока годности.

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

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, и положительные контрольные образцы следует хранить в тёмном месте при 2–8 °С в течение всего срока годности набора. Срок годности набора – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) и его генотипирования методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с детекцией методом гель-электрофореза, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу: ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.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/support/>