

Регистрационные удостоверения:
Influenza A virus, Influenza B virus (ГриппКомплекс)
№ФСР 2011/12014;
Пан H1N1
№ФСР 2010/07921

Наборы реагентов для выявления РНК вирусов гриппа А – Influenza A virus; гриппа В – Influenza B virus; вирусов пандемического гриппа А(H1N1), подобных штамму А/California/4/2009 («свиной грипп») – Пан H1N1, методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени

Информация о наборах

Назначение:

Наборы реагентов предназначены для выявления *in vitro* РНК вирусов гриппа А – Influenza A virus, гриппа В – Influenza B virus и пандемического гриппа А(H1N1), подобных штамму А/California/04/2009 («свиной грипп») – Пан H1N1.

Метод:

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

Материал для исследования:

Мазки и смывы из полости носа и ротоглотки (для Influenza A virus, Influenza B virus, Пан H1N1), материал от падших и больных животных (мазки и смывы из трахеи, полости носа, глотки, клоаки; фекалии; внутренние органы) (для Influenza A virus).

Выделение РНК:

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

Особенности комплектов:

Внутренний контрольный образец (ВК) – присутствует в каждой пробирке с амплификационной смесью, необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96; версия программного обеспечения не ниже 7.3, рекомендуемая версия 7.5.5.23.³

Количество определений:

48

Состав наборов

Реактив	Количество	
Состав комплекта для проведения обратной транскрипции		
• «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»	50 мкл	1 пробирка
• Буферный раствор «ОТ-буфер»	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	25 мкл	1 пробирка
Состав комплекта для ПЦР-амплификации кДНК		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	48 пробирок
• ПЦР-буфер	500 мкл	1 пробирка
• Taq-полимераза	25 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец («К+»)	75 мкл	1 пробирка

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/>

Каналы детекции продуктов амплификации

FAM	HEX	Rox	Cy5	Cy5.5
Influenza A virus	BK	-	-	-
Influenza B virus	BK	-	-	-
Пан H1N1	BK	-	-	-

Инструкция по применению

1. Выделение РНК

При использовании комплекта реагентов ПРОБА-НК осадок после сушки следует растворять в 50 мкл буфера для растворения. ДНК-БК и РНК-БК не используются.

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 °С), затем встряхните пробирку на вортексе в течение 3-5 сек и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3-5 сек.
 - 2.3. Приготовьте ОТ-смесь. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».
 - 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 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.
 - 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.
 - 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 необходимое количество пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации (по одной для каждого исследуемого образца, для отрицательного контрольного образца – «К-» и для положительного контрольного образца – «К+»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 5 пробирок для исследуемых образцов, одну для «К-» и одну для «К+». Общее количество пробирок – 7.

- 3.2. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-полимеразой, затем центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 1-3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 3.3. Приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой. Смешайте в отдельной пробирке:
 - 10x(N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5x(N+1) мкл Taq-полимеразы,где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов, один «К-» и один «К+». Промаркированных пробирок – 7. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы для 8 (7+1) пробирок, т.е. 80 мкл ПЦР-буфера + 4 мкл Taq-полимеразы.

- 3.4. Встряхните пробирку с приготовленной смесью ПЦР-буфера с Taq-полимеразой в течение 3-5 сек на микроцентрифуге/вортексе и центрифугируйте при 1000 об/мин в течение 3-5 сек.
- 3.5. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.
- 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 образцов открывать крышку только той пробирки, в которую будет вноситься данный образец, и закрывать ее перед внесением следующего. Препараты кДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

- 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 этапы выделения РНК и обратной транскрипции, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
 - 3.9. Центрифугируйте пробирки при 1000 об/мин (или на микроцентрифуге/вортексе) в течение 1–3 сек.
 - 3.10. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.
 - 3.11. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите ini файл с соответствующим названием. При последующих постановках добавьте в протокол соответствующий тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п.3.10) и проведите ПЦР.
- 4. Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводится автоматически программным обеспечением для амплификаторов детектирующих.

Условия хранения

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок с запечатанной парафином смесью для амплификации 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 с запечатанной парафином смесью для амплификации и положительные контрольные образцы следует хранить в тёмном месте при 2–8 °С в течение всего срока годности.

Срок годности комплектов – 9 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для проведения обратной транскрипции и ПЦР-амплификации кДНК вирусов гриппа А – Influenza A virus; гриппа В – Influenza B virus; пандемического гриппа А (H1N1), подобных штамму А/California/4/2009 («свиной грипп») – Пан H1N1, 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

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

ДНК-Технология

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