



117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6  
 Тел./факс +7 (495) 640-17-71  
 Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15  
 (звонок по России бесплатный)  
 E-mail: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru),  
[www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

## Комплекты реагентов для ПЦР–амплификации ДНК для последующей детекции методом гель–электрофореза (формат «Форез»)

### Информация о комплектах

#### Назначение:

Комплекты реагентов предназначены для выявления ДНК микроорганизмов в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей детекцией по конечной точке.

#### Выделение ДНК:

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения ДНК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД (ООО «НПО ДНК-Технология»). Для некоторых видов биоматериала требуется предварительная обработка (см. соответствующие инструкции к комплектам реагентов для выделения ДНК и полную инструкцию по применению комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК).

**Внимание!** При выделении ДНК из биоптатов, мокроты, бронхоальвеолярного лаважа, мекония, желудочного сока, фекалий следует использовать только комплекты реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-ГС. Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта у мужчин.

#### Приборное обеспечение:

Термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»); источник постоянного тока, например, «Эльф» (ООО «НПО ДНК-Технология»); камера для электрофореза; трансиллюминатор.

**Внимание!** Возможность использования для проведения ПЦР приборов других производителей необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».

#### Время проведения анализа (без учета пробоподготовки):

от 1,5 часов.

#### Количество определений:

50/100

### Состав комплектов:

Реактив	Количество			
	на 50 определений		на 100 определений	
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином <sup>1</sup>	20 мкл	50 пробирок	20 мкл	100 пробирок
• Раствор Таq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка	500 мкл	2 пробирки
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец	75 мкл	1 пробирка	150 мкл	1 пробирка

### Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Комплекты следует хранить при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности.

**Примечание.** Допускается хранение пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, в защищенном от света месте при температуре от 18 °С до 25 °С в течение всего срока годности.

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

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

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для последующей детекции методом гель–электрофореза, 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, [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru).

Служба клиентской поддержки: 8 (800) 200-75-15 (звонок по России бесплатный),  
 E-mail: [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru).

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:  
[http://www.dna-technology.ru/customer\\_support/](http://www.dna-technology.ru/customer_support/)

<sup>1</sup> - комплекты реагентов для ПЦР–амплификации в зависимости от наименования выпускаются в пробирках 0,5 и 0,2 мл.

**Материал для исследования**

Выявляемый микроорганизм	№ РУ	Вид биологического материала
Вирус варицелла зостер (VZV)	РЗН 2013/1258	Соскобы из поражений кожи и слизистых
Вирус герпеса человека тип 6 (HHV6)	ФСР 2010/06932	Лимфоциты периферической крови, ликвор, слюна, моча и др.
Вирус герпеса человека тип 8 (HHV8)	ФСР 2010/06933	Лимфоциты периферической крови, сперма, секрет предстательной железы, биоптаты и др.
Вирус папилломы тип 16 (HPV16)	ФСР 2008/03845	Соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала, прямой кишки, ротоглотки, уретры, биоптаты
Вирус папилломы тип 18 (HPV18)		
Вирус простого герпеса 1, 2 (HSV-1,2)	ФСР 2008/03946	Лимфоциты периферической крови, слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	ФСР 2010/06934	Слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, моноклеарная фракция клеток периферической крови
Гарднерелла вагиналис ( <i>Gardnerella vaginalis</i> )	ФСР 2008/03846	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Кандида альбиканс ( <i>Candida albicans</i> )	ФСР 2008/03847	
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс ( <i>M.tuberculosis – M. bovis</i> )	ФСР 2008/03849	Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, хирургический материал (содержимое туберкуломы)
Микоплазма гениталиум ( <i>Mycoplasma genitalium</i> )	ФСР 2008/02550	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Микоплазма хоминис ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	ФСР 2008/02551	
Нейссерия гонореи ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> )	ФСР 2008/03850	
Токсоплазма гондии ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	ФСР 2008/03944	
Трихомонас вагиналис ( <i>Trichomonas vaginalis</i> )	ФСР 2008/03848	Ликвор, биоптаты и др.
Уреаплазма парвум ( <i>Ureaplasma parvum</i> )	ФСР 2009/04072	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и уреаплазма парвум ( <i>Ureaplasma urealyticum+Ureaplasma parvum</i> )		
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) ( <i>Ureaplasma urealyticum</i> )		
Хламидия трахоматис ( <i>Chlamydia trachomatis</i> )	ФСР 2008/03890	
Цитомегаловирус (CMV)	ФСР 2008/03945	Слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, моноклеарная фракция клеток периферической крови

**Проведение анализа**

**1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции**

- 1.1 Промаркируйте по одной пробирке со смесью для амплификации для каждого исследуемого образца, отрицательного контрольного образца («К-») и положительного контрольного образца («К+»).
- 1.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.
- 1.3 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы.
- 1.4 Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 1.5 Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК 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. В пробирки «К-», «К+» ДНК не вносится.
- 1.6 Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы пробоподготовки, в пробирку, маркированную «К-». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».

## Изучите полную инструкцию перед началом работы

1.7 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1-3 сек.

1.8 Установите все пробирки в программируемый амплификатор или термостат для проведения ПЦР (ДНК-амплификатор) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 1-3). Соответствие программ амплификации комплектам реагентов приведено в таблице 4.

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

## 2 Регистрация и учет результатов ПЦР

По окончании реакции амплификации результаты анализируют методом горизонтального геле-электрофореза (см. инструкцию к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом геле-электрофореза). Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы ДНК красно-оранжевого цвета. При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с внутренним контролем, в случае положительного образца возможны два варианта:

1. полоса ДНК на уровне положительного контрольного образца (таблица 4);
2. две полосы ДНК, одна из которых расположена на уровне положительного контрольного образца, а вторая соответствует ДНК внутреннего контроля.

В случае отсутствия специфической ДНК в образце (отрицательный образец) наблюдается только одна полоса, соответствующая ДНК внутреннего контроля.

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 ДНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата ДНК, либо повторное выделение препарата ДНК, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

При использовании комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК без внутреннего контроля, в случае положительного образца в геле наблюдается полоса ДНК на уровне положительного контрольного образца (таблица 4); в случае отсутствия специфической ДНК в образце (отрицательный образец) дорожка в геле пустая.

Таблица 1

Режим амплификации 1

№ 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	1	30	94,0	1	30	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	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	40
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
4	10,0	...	...	10,0	...	...	Хранение

Таблица 2

Режим амплификации 2

№ 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	1	30	94,0	1	30	1
2	94,0	0	20	94,0	0	50	5
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
3	94,0	0	5	94,0	0	50	40
	67,0	0	5	67,0	0	50	
	72,0	0	5	72,0	0	50	
4	10,0	...	...	10,0	...	...	Хранение

Режим амплификации 3

№ 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	1	30	94,0	1	30	1
2	94,0 67,0 72,0	0 0 0	20 5 5	94,0 67,0 72,0	0 0 0	50 50 50	5
3	94,0 67,0 72,0	0 0 0	5 5 5	94,0 67,0 72,0	0 0 0	50 50 50	30
4	10,0	...	...	10,0	...	...	Хранение

Таблица 4

Длина продуктов ПЦР-амплификации

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Длина внутреннего контроля, пар нуклеотидов
Режим амплификации 1		
Вирус варицелла зостер (VZV)	269	560
Вирус герпеса человека 6 типа (HHV-6)	277	560
Вирус герпеса человека 8 типа (HHV-8)	293	560
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	185	560
Кандида альбиканс ( <i>Candida albicans</i> )	310	560
Микоплазма гениталиум ( <i>Mycoplasma genitalium</i> )	203	560
Нейссерия гонореи ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> )	329	560
Токсоплазма гондии ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	187	560
Трихомонас вагиналис ( <i>Trichomonas vaginalis</i> )	218	560
Уреаплазма парвум ( <i>Ureaplasma parvum</i> )	383	560
Уреаплазма уреалитикум (Т-960)( <i>Ureaplasma urealyticum</i> )	206	560
Хламидия трахоматис ( <i>Chlamydia trachomatis</i> )	415	900
Цитомегаловирус (CMV)	280	560
Режим амплификации 2		
Вирус папилломы тип 16 (HPV 16)	367	900
Вирус папилломы тип 18 (HPV 18)	417	900
Вирус простого герпеса 1, 2 (HSV-1,2)	261	900
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс ( <i>M. tuberculosis – M. bovis</i> )	330	900
Микоплазма хоминис ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	310	900
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и Уреаплазма парвум ( <i>Ureaplasma urealyticum+Ureaplasma parvum</i> )	532	900
Режим амплификации 3		
Гарднерелла вагиналис ( <i>Gardnerella vaginalis</i> )	445	900