



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов EBV в фасовке S.
Перед началом работы изучите инструкцию.

Набор реагентов для выявления ДНК Epstein-Barr virus методом ПЦР в режиме реального времени EBV



R1-P209-23/9 (Фасовка S, пробирки)
R1-P209-S3/9 (Фасовка S, стрипы¹)

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК Epstein-Barr virus в биологическом материале человека (кровь, синовиальная жидкость, спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, биоптат или пунктат из очагов поражения органов и тканей, мазок со слизистой ротоглотки, слюна) методом ПЦР в режиме реального времени.

Выделение ДНК²:

Рекомендуются наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-ОПТИМА, ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС (ООО «ДНК-Технология ТС»).

Специализированное оборудование:

Детектирующие амплификаторы планшетного и роторного типа с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени, зарегистрированные в установленном порядке в РФ, например, «ДТпрайм»³ и «ДТлайт»⁴ (ООО «НПО ДНК-Технология»), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH), CFX96 (Био-Рад Лабораториз, Инк), Applied Biosystems QuantStudio 5 («Лайф Текнолоджис Холдингс Пте. Лтд.»).

Время проведения анализа (включая пробоподготовку):

от 2 часов (в зависимости от количества образцов и используемого набора/комплекта реагентов для выделения ДНК).

Количество анализируемых образцов:

96 определений (не более 24 постановок), включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов и положительных контрольных образцов.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок	Номинальный объем компонента
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	по 500 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ⁵	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ⁶		12 шт.	

Таблица 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

Fam/Green	Hex/Yellow/Vic	Rox/Orange	Cy5/Red	Cy5.5/Crimson
EBV	ВК	-	-	-

¹ - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

² - возможность использования набора/комплекта реагентов для выделения ДНК определяется видом биологического материала

³ - модификация *M*

⁴ - модификация *S*

⁵ - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

⁶ - входит в состав набора реагентов при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

Проведение анализа

1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирку со смесью для амплификации!
2. При использовании набора реагентов в варианте исполнения «Фасовка S, стрипы» следует строго соблюдать комплектность стрипов и крышек к ним. Не использовать крышки к стрипам из других наборов реагентов!

- 1.1** Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, для отрицательного контрольного образца (К-) и для положительного контрольного образца (К+).

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии переменного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке.

Пример: Необходимо проанализировать 4 неизвестных образца. Для этого нужно промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.

- 1.2** Встряхните пробирку с раствором Taq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

- 1.3** Добавьте во все промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.

ВНИМАНИЕ! При использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q минеральное масло в пробирки не вносится!

- 1.4** Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Неплотно прикройте пробирку/стрипы крышками.

- 1.5** Встряхните пробирку с положительным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

ВНИМАНИЕ!

1. Перед внесением в пробирки с реакционной смесью для препарата ДНК и отрицательного контрольного образца необходимо выполнить рекомендации по использованию препарата ДНК, приведённые в инструкции по применению набора/комплекта реагентов для выделения НК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-ГС (только в случае, если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки) встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

3. При использовании для выделения ДНК наборов реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД, ПРОБА-МЧ МАКС необходимо, не встряхивая, центрифугировать пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с, затем поместить пробирки с препаратом ДНК в магнитный штатив. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, следует встряхнуть пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугировать на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

4. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. В случае использования стрипов следует закрывать крышку стрипа после внесения в него образцов перед началом работы со следующим. Закрывайте пробирки/стрипы плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 1.6** Внесите в соответствующие промаркированные пробирки, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки, промаркированные «К-», «К+», ДНК не вносится.

- 1.7** Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

- 1.8** Внесите в пробирку, промаркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.

- 1.9** Центрифугируйте все пробирки/стрипы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с (при использовании для проведения ПЦР детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q центрифугирование не обязательно).

- 1.10** Установите все пробирки/стрипы в детектирующий амплификатор.

- 1.11** Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест¹. Далее и при последующих постановках создайте соответствующий протокол исследования: укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательного и положительных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок/стрипов на матрице термоблока в соответствии с их установкой и проведите ПЦР. При выборе теста должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

¹ - тест для детектирующих амплификаторов серии ДТ создаётся путём ввода параметров (параметры теста указаны в Приложении А инструкции по применению) или предоставляется производителем набора реагентов

- 1.12** Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5: Проведите ПЦР с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведенным в таблицах 3, 4, 5 соответственно.

Т а б л и ц а 2 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов «ДТпрайм», «ДТлайт»

№ блока	Температура, °C	мин	с	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80	0	30	1		Цикл
	94	1	30			
2	94	0	30	5		Цикл
	64	0	15		√	
3	94	0	10	45		Цикл
	64	0	15		√	
4	94	0	5	1		Цикл
5	25 ¹	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Т а б л и ц а 3 – Программа амплификации для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

№ / Cycling	Температура, °C / Temperature	Время, с / Hold Time, s	Количество циклов / Cycle Repeats
Cycling	80 deg	60	1 time
	94 deg	90	
Cycling 2	94 deg	30	5 times
	57 deg √	15	
Cycling 3	94 deg	10	45 times
	57 deg √	15	

√ - режим оптических измерений (Acquiring), установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C

Т а б л и ц а 4 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов CFX96

№ блока (Step)	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
1	80	01:00	1
2	94	01:30	1
3	94	0:15	50
4	64 √	0:20	

√ - режим оптических измерений (Plate Read), установить измерение флуоресценции по необходимым каналам детекции (Fam, Hex) при 64 °C

Т а б л и ц а 5 – Программа амплификации для детектирующих амплификаторов Applied Biosystems QuantStudio 5

Стадия	№ шага	Температура, °C	Время, мин: сек	Количество циклов (повторов)
Стадия удержания	1	80	01:00	1
	2	94	01:30	1
Стадия ПЦР	1	94	0:20	50
	2	64 √	0:20	

√ - сбор данных для необходимых флуорофоров (Fam, Vic (Hex)) включен

¹ - допускается хранение при температуре 10 °C

- 2 **Регистрация и учёт результатов ПЦР** проводятся автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.
- При использовании детектирующих амплификаторов CFX96 следует использовать регрессионный тип анализа (Cq Determination Mode: Regression), во вкладке «Baseline Subtraction» необходимо выбрать «Baseline Subtraction Curve Fit».
- Интерпретация результатов проводится в соответствии с таблицей 6. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Т а б л и ц а 6 – Интерпретация результатов ПЦР

Канал детекции		Интерпретация результата
Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы		
Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК Epstein-Barr virus (EBV)
Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК Epstein-Barr virus (EBV)
Не указан	Не указан	Недоверенный результат
Отрицательный контрольный образец		
Не указан	Указан	Отрицательный результат Результаты постановки валидны
Положительный контрольный образец		
Указан	Не учитывается	Положительный результат Результаты постановки валидны

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера, соответствующей условиям хранения компонентов, входящих в состав набора реагентов.

Допускается транспортирование набора реагентов в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температуре внутри термоконтейнера от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора реагентов. Смесь для амплификации, запечатанную парафином, следует хранить в защищённом от света месте.

Срок годности набора реагентов – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов, следует обращаться в службу клиентской поддержки.


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

+7 (495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный).

E-mail: hotline@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Символы, используемые при маркировке набора реагентов

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Номер по каталогу
	Температурный диапазон		Изготовитель
	Содержимого достаточно для проведения <n> тестов		Не допускать воздействия солнечного света
	Использовать до		Нестерильно
	Код партии (серии)		Обратитесь к инструкции по применению или к инструкции по применению в электронном виде
	Дата изготовления		