



В данном вкладыше приведена информация для набора реагентов ННВ-8 в фасовке S. Перед началом работы изучите инструкцию.

## Набор реагентов для выявления ДНК Human herpesvirus 8 методом ПЦР в режиме реального времени ННВ-8

**R1-P212-23/9 (Фасовка S, пробирки)****R1-P212-S3/9 (Фасовка S, стрипы<sup>1</sup>)**

### Информация о наборе реагентов

**Назначение:**

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК Human herpesvirus 8 в биологическом материале человека (кровь, биоптат или пунктат из очагов поражения органов и тканей) методом ПЦР в режиме реального времени.

**Выделение ДНК<sup>2</sup>:**

Рекомендуются наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-ОПТИМА, 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»<sup>3</sup> и «ДТлайт»<sup>4</sup> (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 Таq-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 <sup>5</sup> | Прозрачная бесцветная жидкость   | 1 пробирка                               | 130 мкл                      |
| Крышки для стрипов <sup>6</sup>                |  | 12 шт.                                   |                              |

Т а б л и ц а 1 – Каналы детекции продуктов амплификации

| Fam/Green | Hex/Yellow/Vic | Rox/Orange | Cy5/Red | Cy5.5/Crimson |
|-----------|----------------|------------|---------|---------------|
| ННВ-8     | ВК             | -          | -       | -             |

<sup>1</sup> - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

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

<sup>3</sup> - модификация \*M\*

<sup>4</sup> - модификация \*S\*

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

<sup>6</sup> - 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 Таq-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 Таq-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 пробирки/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 ДНК.

2. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК, 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 набора реагентов 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-» и «К+», ДНК не вносится.

- 1.7** Внесите в пробирку, промаркированную «К-», не повреждая слой парафина, по 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 и проведите ПЦР.

#### 1.11 Для детектирующих амплификаторов серии ДТ:

Запустите программное обеспечение детектирующего амплификатора. При первом проведении ПЦР загрузите соответствующий тест<sup>1</sup>. 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.

<sup>1</sup> - 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 <sup>1</sup> | ... | ... | 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 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

<sup>1</sup> - 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<br>(искомая ДНК),<br>Cp/Cq/Ct  | Hex/Yellow/Vic<br>(внутренний контроль),<br>Cp/Cq/Ct |   |
| <b>Неизвестные образцы</b>               |  |   |
| <b>Указан</b>                            | Не учитывается                                       | <b>Обнаружена ДНК Human herpesvirus 8 (HHV-8)</b>               |
| Не указан                                | <b>Указан</b>  | Не обнаружена ДНК Human herpesvirus 8 (HHV-8)                   |
| Не указан                                | Не указан  | Недостовверный результат  |
| <b>Отрицательный контрольный образец</b> |  |   |
| Не указан                                | <b>Указан</b>  | <b>Отрицательный результат</b><br>Результаты постановки валидны |
| <b>Положительный контрольный образец</b> |  |   |
| <b>Указан</b>                            | Не учитывается                                       | <b>Положительный результат</b><br>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 места.

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                                   |   |   |