



Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для флуоресцентной детекции по конечной точке (формат «FLASH»)

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.

Метод:

Полимеразная цепная реакция с флуоресцентной детекцией результатов по конечной точке; качественный анализ.

Выделение ДНК:

Рекомендуются комплекты реагентов для выделения ДНК (ООО «НПО ДНК-Технология») ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС и ПРОБА-РАПИД. 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.

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»)

Детектор флуоресцентный «Джин» (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 3.3, рекомендуемая версия 4.4.0.10

или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 4.4.0.8, рекомендуемая версия 4.4.0.10.

Внимание! Возможность использования приборов других производителей необходимо уточнить у представителя компании.

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 ¹	20 мкл	50 пробирок	20 мкл	100 пробирок
• Раствор Таq-полимеразы	500 мкл	1 пробирка	500 мкл	2 пробирки
• ПЦР-буфер (фон)	200 мкл	1 пробирка	200 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	1 пробирка	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец	75 мкл	1 пробирка	150 мкл	1 пробирка

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5
Специфический продукт	ВК	-	-

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.

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

Срок годности комплектов – 12 месяцев со дня приемки ОТК предприятия-изготовителя при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

¹ – комплекты реагентов для ПЦР-амплификации (формат «FLASH») в зависимости от наименования выпускаются в пробирках 0,5 и 0,2 мл.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для флуоресцентной детекции по конечной точке, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6, тел./факс +7 (495) 640-17-71, 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/customer_support/

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 6 типа (HHV6)	ФСР 2010/06932	Лимфоциты периферической крови, ликвор, слюна, моча и др.
Вирус герпеса человека 8 типа (HHV8)	ФСР 2010/06933	Лимфоциты периферической крови, сперма, секрет предстательной железы, биоптаты и др.
Вирус папилломы тип 16 (HPV16)	ФСР 2008/03845	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
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, мононуклеарная 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	
Листерия моноцитогенес (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ФСР 2010/06931	Ликвор, соскобы со слизистых, околоплодные воды, меконий, биоптаты
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс (<i>M.tuberculosis – M. bovis</i>)	ФСР 2008/03849	Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, хирургический материал (содержимое туберкулемы)
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	Ликвор, биоптаты и др.
Трихомонас вагиналис (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	ФСР 2008/03848	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma parvum</i>)	ФСР 2009/04072	
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и уреаплазма парвум (<i>U. urealyticum + U. parvum</i>)		
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)		
Хламидия трахоматис (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	ФСР 2008/03890	Соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища
Цитомегаловирус (CMV)	ФСР 2008/03945	Слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, мононуклеарная 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-»), положительного контрольного образца («К+») и две нормировочные пробирки для контроля фона флуоресценции («ФОН»).
- 1.2. Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

- 1.3. Добавьте в каждую пробирку (за исключением пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. В пробирки, маркированные «ФОН», добавьте по 10 мкл ПЦР-буфера.
- 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+» и «ФОН» ДНК не вносится.
- 1.6. Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы прободопготовки, в пробирки, маркированные «К-» и «ФОН». Внесите, не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца в пробирку, маркированную «К+».
- 1.7. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1-3 сек.
- 1.8. Установите все пробирки в амплификатор или термостат программируемый и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (Таблицы 1, 2, 3). Соответствие программ амплификации комплектам реагентов приведено в таблице 4.

Примечание. При использовании «Терцик» необходимо выбрать алгоритм регулирования «Точный». Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК. Готовые нормировочные пробирки «ФОН» необходимо хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °С в течение 1 месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для чего за 1 час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

2. Регистрация и учёт результатов ПЦР.

Детекция и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК проводятся с помощью ПЦР-детектора «Джин» или «Джин-4» согласно инструкции к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контроля – 2,50).

Примечание. Тест-системы предназначены для детекции результатов ПЦР методом флуоресцентной детекции по конечной точке. В качестве альтернативного способа учёта результатов возможно использование метода гель-электрофореза (см. таблицу 4 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

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	00	94,0	1	00	1
2	94,0	0	5	94,0	0	50	5
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	67,0	0	5	67,0	0	50	
3	94,0	0	1	94,0	0	50	40
	64,0	0	5	64,0	0	50	
	67,0	0	5	67,0	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	00	94,0	1	00	1
2	94,0	0	5	94,0	0	50	5
	67,0	0	15	67,0	0	50	
3	94,0	0	1	94,0	0	50	40
	67,0	0	15	67,0	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, °C	Время		Температура, °C	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	1	00	94,0	1	00	1
2	94,0 67,0	0 0	5 15	94,0 67,0	0 0	50 50	5
3	94,0 67,0	0 0	1 15	94,0 67,0	0 0	50 50	30
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 4

Длины продуктов ПЦР-амплификации ДНК

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Внутренний контроль, пар нуклеотидов
Режим амплификации 1		
Вирус варицелла зостер (VZV)	269	560
Вирус герпеса человека тип 6 (HHV6)	277	560
Вирус герпеса человека тип 8 (HHV8)	293	560
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	185	560
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	310	560
Листерия моноцитогенес (<i>Listeria monocytogenes</i>) ²	67	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 (T-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 (HPV16)	367	900
Вирус папилломы тип 18 (HPV18)	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 (T-960) и уреоплазма парвум (<i>U. urealyticum + U. parvum</i>)	532	900
Режим амплификации 3		
Гарднерелла вагиналис (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	445	900

² – продукты амплификации специфичной ДНК (*Listeria monocytogenes*) не детектируются в стандартных 1,5% агарозных гелях.