



Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time»)

Информация о комплектах

Назначение:

Комплекты реагентов предназначены для выявления ДНК микроорганизмов в биологическом материале человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Метод:

Полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени; качественный анализ.

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. При выделении ДНК из плазмы крови и иксодовых клещей следует использовать только комплект реагентов ПРОБА-НК.

Особенности комплектов:

Внутренний контрольный образец (ВК) – необходим для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

Приборное обеспечение:

Амплификаторы детектирующие ДТ-322, ДТлайт¹, ДТпрайм² или ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»); версия программного обеспечения не ниже 7.3.4.0³.

или амплификаторы iCycler iQ и iQ5 (Bio-Rad Laboratories).

ВНИМАНИЕ! Возможность использования других амплификаторов необходимо уточнить у представителя компании «ДНК-Технология».

Время проведения анализа (без учёта пробоподготовки):

от 1,5 часов.

Количество определений:

48/96

Каналы детекции продуктов амплификации

Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
Специфический продукт	ВК	-	-	-

Состав комплектов

Реактив	Количество			
	на 48 определений		на 96 определения	
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	48 пробирок или 6 стрипов по 8 пробирок	20 мкл	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок
• Раствор Taq-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
• Крышки для стрипов ⁴		6 шт.		12 шт.

¹ – только модели 4S1; 4S2; 5S1; 5S2; 6S1; 6S2.

² – только модели 4M1; 4M3; 4M6; 5M1; 5M3; 5M6; 6M1; 6M3; 6M6.

³ – производитель рекомендует своевременно обновлять программное обеспечение для детектирующих амплификаторов. Актуальную версию программного обеспечения можно скачать на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/po/>

⁴ – в случае использования стрипованных пробирок.

Материал для исследования

Выявляемый микроорганизм	№ РУ	Вид биологического материала
Боррелия бургдорфери (<i>Borrelia burgdorferi</i>)	ФСР 2008/03505	Плазма крови человека, иксодовые клещи
Вирус варицелла зостер (VZV)	РЭН 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 Эпштейна-Барр (EBV)	ФСР 2010/06934	Слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, мононуклеарная фракция клеток периферической крови
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)
Токсоплазма гондии (<i>Toxoplasma gondii</i>)	ФСР 2008/03944	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</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>)		
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)		

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 Taq-полимеразы в течение 3–5 с и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 1.3 Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы.
- 1.4 Добавьте в каждую пробирку по одной 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+».
- 1.7 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1–3 с.
- 1.8 Установите все пробирки в блок детектирующего амплификатора.
- 1.9 Для приборов ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:
Запустите программное обеспечение RealTime_PCR в режиме «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР создайте и сохраните новый тест. При последующих постановках добавляйте в протокол сохраненный тест, укажите количество и идентификаторы образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (1.8) и проведите ПЦР (таблица 1).

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Таблица 1 - Программа амплификации для амплификаторов детектирующих ДТ-322, ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96

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

Для приборов iQ, iQ5:

Включите прибор и блок питания оптической части прибора, оставьте для прогрева на 30 минут. Запустите программное обеспечение iCycler (или Bio-Rad iQ5). При первой постановке создайте и сохраните новый протокол. При последующих постановках выберите сохраненный протокол, настройте конфигурацию плашки (файл с данными о характеристике образцов и их расположении в плашке) и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 2, 3).

Таблица 2 - Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ5 (при использовании Persistent Well Factor)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
1	1	1	1 min	80,0	
		2	1 min 30 sec	94,0	
2	5	1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	45	1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
4		10,0	storage

Таблица 3 - Режим амплификации для детектирующего амплификатора iCycler iQ

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, °C	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwcf.tmo					
1	1	1	1 min	80,0	
		2	1 min 30 sec	94,0	
2	5	1	30 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	
3	2	1	30 sec	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45	1	10 sec	94,0	
		2	45 sec	64,0	Real Time
5		10,0	storage

- 2 **Регистрация и учёт результатов** ПЦР проводится автоматически программным обеспечением для детектирующих амплификаторов.

Изучите полную инструкцию перед началом работы

Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

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

П р и м е ч а н и е - Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в защищённом от света месте при температуре от 2 °С до 8 °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 при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени, 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.

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

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

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