



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

### Информация о комплектах реагентов

**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 ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС и ПРОБА-РАПИД (ООО «НПО ДНК-Технология»). Для некоторых видов биоматериала требуется предварительная обработка (см. соответствующие инструкции к комплектам реагентов для выделения 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 реагентов:**

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

**Специализированное оборудование:**

Термостат программируемый для проведения ПЦР анализа четырехканальный «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология»)

Детектор флуоресцентный «Джин» или «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология»)

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

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

от 1,5 часов.

**Количество определений:**

50/100 (включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов).

#### Состав комплектов реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок		Номинальный объем компонента	
		на 50 определений	на 100 определений	на 50 определений	на 100 определений
Смесь для амплификации, запечатанная парафином <sup>1</sup>	Прозрачная жидкость под воскообразным белым слоем	50 пробирок	100 пробирок	по 20 мкл	
Раствор Taq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	2 пробирки	по 500 мкл	
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка		200 мкл	
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1 пробирка	2 пробирки	по 1,0 мл	
Положительный контрольный образец	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка		75 мкл	150 мкл

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

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

Fam	Hex	Rox	Cy5
Специфический продукт	ВК	-	-

### Характеристики комплектов реагентов

REF	Выявляемый микроорганизм	№ РУ	Вид биологического материала
F1-P206-21/2 (пробирки 0,2 мл) F1-P206-51/2 (пробирки 0,5 мл)	Вирус варицелла зостер (VZV)	РЗН 2013/1258	Соскобы из поражений кожи и слизистых
F1-P202-51/1	Вирус герпеса человека тип 6 (HHV6)	ФСР 2010/06932	Лимфоциты периферической крови, ликвор, слюна, моча и др.
F1-P203-51/1	Вирус герпеса человека тип 8 (HHV8)	ФСР 2010/06933	Лимфоциты периферической крови, эякулят, секрет предстательной железы, биоптаты и др.
F1-P205-21/1 (пробирки 0,2 мл) F1-P205-51/1 (пробирки 0,5 мл)	Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	ФСР 2010/06934	Слюна, моча, соскобы из уретры, цервикального канала, заднего свода влагалища, мононуклеарная фракция клеток периферической крови
F1-P003-51/2	Листерия моноцитогенес ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	ФСР 2010/06931	Ликвор, соскобы со слизистых, околоплодные воды, меконий, биоптаты
F1-P404-51/2	Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс ( <i>M.tuberculosis – M. bovis</i> )	ФСР 2008/03849	Мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, хирургический материал (содержимое туберкуломы)
F1-P001-51/1	Токсоплазма гондии ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	ФСР 2008/03944	Ликвор, биоптаты и др.

### Проведение анализа

#### 1 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

**ВНИМАНИЕ!** При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесями для амплификации!

- 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 Taq-полимеразы в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 1.3** Добавьте в каждую пробирку (за исключением пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Taq-полимеразы. Добавьте в пробирки, маркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).
- 1.4** Добавьте в каждую пробирку по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.
- 1.5** Встряхните пробирки с исследуемыми и контрольными образцами в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1–3 с на микроцентрифуге-вортексе.

#### **ВНИМАНИЕ!**

1. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС необходимо после встряхивания центрифугировать пробирки с препаратом ДНК при 16000 x g (соответствует 13000 об/мин на центрифуге Heraeus Pico 17) при комнатной температуре (от 18 °C до 25 °C) в течение одной минуты для осаждения сорбента. В случае если после выделения надосадочная жидкость, содержащая выделенную ДНК, была перенесена в новые пробирки, центрифугирование после встряхивания производится в течение 3–5 с на микроцентрифуге-вортексе.

Относительное ускорение центрифуги (RCF или g) зависит от частоты вращения и радиуса ротора. Для определения соответствия центрифуги заданным параметрам центрифугирования обратитесь к руководству по эксплуатации.

2. Для предотвращения контаминации следует перед внесением препарата ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением

следующего. Закрывайте пробирки плотно. Препараты ДНК и контрольные образцы следует вносить наконечниками с фильтром.

- 1.6** Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК. В пробирки «К-», «К+» и «ФОН» ДНК не вносится.
- 1.7** Внесите в пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего все этапы прободготовки. Внесите в пробирку, маркированную «К+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 1.8** Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 1.9** Установите все пробирки в амплификатор или программируемый термостат и проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл (таблицы 2, 3). Соответствие программ амплификации комплектов 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 не более одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °С до 25 °С), для чего за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

Т а б л и ц а 2 - Режим амплификации 1

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	с		мин	с	
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

Т а б л и ц а 3 - Режим амплификации 2

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	с		мин	с	
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

Т а б л и ц а 4 - Режимы амплификации

Выявляемый микроорганизм	Режим амплификации
Вирус варицелла зостер (VZV)	1
Вирус герпеса человека тип 6 (HHV6)	
Вирус герпеса человека тип 8 (HHV8)	
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	
Листерия моноцитогенес ( <i>Listeria monocytogenes</i> ) <sup>2</sup>	
Токсоплазма гондии ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	2
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс ( <i>M.tuberculosis – M. bovis</i> )	

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

## 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).

### Условия транспортирования, хранения и эксплуатации

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

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

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






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

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для флуоресцентной детекции по конечной точке, 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](mailto:hotline@dna-technology.ru), [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru)

### Символы, используемые при маркировке комплектов реагентов

	Медицинское изделие для диагностики <i>in vitro</i>		Обратитесь к инструкции по применению
	Предел температуры		Номер по каталогу
	Содержимого достаточно для проведения <i>n</i> тестов		Изготовитель
	Использовать до		Не допускается воздействие солнечного света
	Номер серии		Нестерильно
	Дата изготовления		