



Регистрационное удостоверение
№ ФСР 2008/03850 от 18 декабря 2023 г.



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

Набор реагентов для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*) методом полимеразной цепной реакции

ГОНО-ГЕН

R1-P109-23/9 (Фасовка S, пробирки, «Real-time»)

REF

R1-P109-S3/9 (Фасовка S, стрипы¹, «Real-time»)

F1-P109-51/1 (Фасовка S, пробирки 0,5 mL, «Flash»)

Информация о наборе реагентов

Назначение:

Набор реагентов предназначен для выявления ДНК нейссерии гонореи (*Neisseria gonorrhoeae*) методом ПЦР в биологическом материале человека: соскобы эпителиальных клеток из урогенитального тракта, моча, секрет простаты, эякулят.

Набор реагентов ГОНО-ГЕН в фасовке S выпускается в следующих вариантах исполнения:

- ПЦР с детекцией в режиме реального времени (маркируется - «Real-time»);
- ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке (маркируется - «Flash»).

Выделение ДНК²:

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

Примечание - Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта мужчин.

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 для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» и 100 определений для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке», включая анализ неизвестных образцов, отрицательных контрольных образцов, положительных контрольных образцов и фоновых пробирок. Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» предусмотрено не более 24 постановок, для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» - не более 10 постановок.

Состав набора реагентов:

Наименование компонента	Внешний вид	Количество пробирок		Номинальный объём компонента
		«Flash»	«Real-time»	
Смесь для амплификации, запечатанная парафином	Прозрачная бесцветная или розовая жидкость под воскообразным белым слоем	100 пробирок	96 пробирок или 12 стрипов по 8 пробирок	по 20 мкл
Раствор Таq-полимеразы	Прозрачная бесцветная жидкость	2 пробирки	2 пробирки	по 500 мкл
ПЦР-буфер (фон)	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	-	200 мкл
Минеральное масло	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	2 пробирки	2 пробирки	по 1,0 мл
Положительный контрольный образец ³	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	1 пробирка	130 мкл
Крышки для стрипов ⁴		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
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	BK	-	-	-

¹ - не используется для детектирующего амплификатора Rotor-Gene Q

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

³ - на этикетке компонента для всех фасовок «Положительный контрольный образец» указывается как «K+»

⁴ - при расфасовке смеси для амплификации, запечатанной парафином, в стрипы

Проведение анализа

1 Выделение ДНК

Для выделения ДНК рекомендуется использовать наборы/комплекты реагентов для выделения НК ПРОБА-НК, ПРОБА-ГС, ПРОБА-РАПИД, ПРОБА-МЧ-РАПИД.

Примечание - Не рекомендуется использовать комплект реагентов ПРОБА-РАПИД при выделении ДНК из соскобов из урогенитального тракта мужчин.

ВНИМАНИЕ! Одновременно с выделением ДНК из биологического материала необходимо подготовить отрицательный контрольный образец и провести его через все этапы пробоподготовки. Для этого рекомендуется использовать физиологический раствор или отрицательный контрольный образец, входящий в состав набора/комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот в объеме, указанном в инструкции по применению соответствующего набора/комплекта реагентов.

2 Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

ВНИМАНИЕ!

1. При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки 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!

2.1 Промаркируйте по одной пробирке/стрипованной пробирке со смесью для амплификации, запечатанной парафином, для каждого неизвестного образца, отрицательного контрольного образца (К-) и положительного контрольного образца (К+). При использовании набора реагентов в варианте исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

ВНИМАНИЕ! Количество реагентов рассчитано не более чем на 24 постановки при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца и 1 положительного контрольного образца в каждой постановке (вариант исполнения «Real-time») или не более чем на 10 постановок при условии вариабельного количества неизвестных образцов, 1 отрицательного контрольного образца, 1 положительного контрольного образца и 2 пробирок «ФОН» (вариант исполнения «Flash») в каждой постановке.

Пр и м е р : необходимо проанализировать 4 образца. Для этого нужно:

- «ПЦР с детекцией в режиме реального времени» (Real-time): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-» и одну пробирку для «К+». Общее количество пробирок – 6.
- «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке» (Flash): промаркировать 4 пробирки для неизвестных образцов, одну пробирку для «К-», одну пробирку для «К+», две пробирки «ФОН». Общее количество пробирок – 8.

2.2 Встряхните пробирку с раствором Таq-полимеразы на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

2.3 Добавьте в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл раствора Таq-полимеразы. Добавьте в пробирки, промаркированные «ФОН», по 10 мкл ПЦР-буфера (фон).

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

2.4 Добавьте в каждую пробирку (при необходимости) по одной капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте пробирки/стрипы.

2.5 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. При использовании для выделения ДНК комплектов реагентов ПРОБА-НК и ПРОБА-РАПИД встряхните пробирку 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.

2. При использовании для выделения ДНК комплекта реагентов ПРОБА-ГС встряхните пробирки с препаратом ДНК и отрицательным контрольным образцом на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с и центрифугируйте при RCF(g) 12000 - 16000 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 на микроцентрифуге-вортексе в течение 3-5 с.

3. При использовании для выделения ДНК набора реагентов ПРОБА-МЧ-РАПИД 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.

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

2.7 Внесите в пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

Примечание - Готовые нормировочные пробирки «ФОН» допускается использовать многократно при каждой детекции результатов ПЦР с реакционными пробирками из той же серии набора реагентов при условии использования того же набора/комплекта реагентов для выделения ДНК. Нормировочные пробирки следует хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в защищенном от света месте в течение одного месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (от 18 °C до 25 °C), для этого за один час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

- 2.8** Внесите в пробирку, промаркированную «K+», не повреждая слой парафина, 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 2.9** 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).
- 2.10** Установите все пробирки/стрипы в программируемый термостат/амплификатор или в детектирующий амплификатор.
- 2.11** Для варианта исполнения «ПЦР с флуоресцентной детекцией по конечной точке»:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, в режиме, приведённом в таблице 2.

Таблица 2 – Программа амплификации для амплификаторов с активным регулированием (например, программируемый термостат Терцик). Время в скобках указано для амплификаторов без активного регулирования.

№ п.п.	Температура, °C	Время		Количество циклов
		мин	с	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	05 (50)	5
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
3	94,0	0	01 (50)	40
	64,0	0	05 (50)	
	67,0	0	05 (50)	
4	10,0	Хранение

Примечание - Более подробное описание программирования и управления программируемым термостатом «Терцик» содержится в инструкции по эксплуатации прибора (см. «Руководство пользователя»).

- 2.12** Для варианта исполнения «ПЦР с детекцией в режиме реального времени»:

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 3.

Для детектирующих амплификаторов Rotor-Gene Q, CFX96 и Applied Biosystems QuantStudio 5:

Проведите ПЦР с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл, по программам амплификации, приведённым в таблицах 4, 5, 6 соответственно.

Таблица 3 – 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	10	Хранение		Хранение

√ - режим оптических измерений

Таблица 4 – 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, установить измерение флуоресценции (Acquiring) по каналам детекции Green (Fam) и Yellow (Hex) при 57 °C.

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.

Таблица 5 – 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

Таблица 6 – 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

3 Регистрация и учёт результатов ПЦР осуществляются автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

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 7. Результаты постановки валидны, если выполняются условия интерпретации результатов, полученных для контрольных образцов.

Таблица 7 – Интерпретация результатов ПЦР

Flash	Real-time		Интерпретация результата
Результат, полученный на флуоресцентном детекторе «ДЖИН» или «ДЖИН-4»	Канал детекции Fam/Green (искомая ДНК), Cp/Cq/Ct	Канал детекции Hex/Yellow/Vic (внутренний контроль), Cp/Cq/Ct	
Неизвестные образцы			
«+»	Указан	Не учитывается	Обнаружена ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> («+»)
«-»	Не указан	Указан	Не обнаружена ДНК <i>Neisseria gonorrhoeae</i> («-»)
«нд»	Не указан	Не указан	Недостовверный результат («нд»)
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 °C до 25 °C не более 5 суток.

Все компоненты набора реагентов следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °C до 8 °C в течение всего срока годности.

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

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