

Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК HAV, HCV, HDV, HGV, HIV и ДНК HBV

Назначение

Комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК HAV, HCV, HDV, HGV, HIV и ДНК HBV предназначены для проведения скринингового исследования на вирусы гепатитов HAV, HCV, HDV, HGV, HBV и на вирус иммунодефицита человека (HIV).

Скрининговое исследование состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК/РНК проводится с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК, укомплектованного двумя внутренними контролями РНК-ВК и ДНК-ВК.
2. Постановка обратной транскрипции выполняется с использованием комплекта реагентов «ОТ-МIX», содержащего ОТ-праймеры для HAV, HCV, HDV, HGV и HIV.
3. ПЦР проводится с комплектами реагентов, специфичными для каждой инфекции.
4. Детекция осуществляется в зависимости от формата комплекта реагентов ПЦР.

Рис.1. Схема проведения анализа

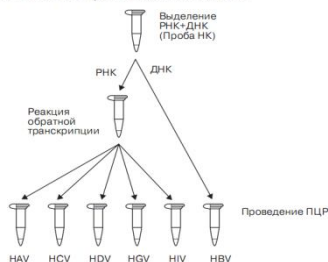


Таблица 1. Форматы выпускаемых комплектов

	Форез	FLASH	Real-time
HAV	+	+	
HBV	+	+	+
HCV	+	+	+
HDV	+	+	
HGV	+		
HIV	+	+	+

Состав (96 определений)

Реактив	Количество	
Комплект реагентов для обратной транскрипции «ОТ-МIX»		
• «ОТ-буфер»	200 мкл	1 пробирка
• «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV и дНТФ ¹ »	100 мкл	1 пробирка
• Обратная транскриптаза	50 мкл	1 пробирка
Комплект реагентов для ПЦР-амплификации		
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином ²	20 мкл	96 пробирок или 12 стрипов
• ПЦР-буфер	500 мкл	2 пробирки
• Taq-полимераза	50 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец («К+») ²	150 мкл	1 пробирка

¹ «ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV праймеры и дНТФ» представляют собой универсальную ОТ-смесь, которая может быть использована для постановки реакции обратной транскрипции РНК HAV, HCV, HDV, HGV и HIV.

² Смесь для амплификации, запечатанная парафином, и положительный контрольный образец являются специфичными для каждой инфекции. Обращайте внимание на маркировку пакетов и пробирок!

Условия хранения

Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, за исключением пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается многократное замораживание ПЦР-буфера и минерального масла.

Пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить в тёмном месте при 2-8°C в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается хранения пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, при температуре 18-25°C.

Срок годности комплектов: формат «FLASH» – 6 мес., форматы «Форез» и «Real-time» – 9 мес. с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплектов реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР-амплификации кДНК следует обращаться в ООО «НПО ДНК-Технология» по адресу: 117587, Москва, Варшавское шоссе, д.125ж, к.6. Тел./факс +7 (495) 980-45-55, E-mail: help@dna-technology.ru, www.dna-technology.ru, анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»:

<http://www.dna-technology.ru/support/>

Инструкция по применению

1. Выделение РНК/ДНК с использованием комплекта реагентов ПРОБА-НК

В состав комплекта ПРОБА-НК входят два внутренних контрольных образца РНК-ВК и ДНК-ВК, которые добавляются в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот, что позволяет оценить качество всех этапов исследования.

Внимание!

- При одновременном исследовании образца на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HAV, HCV, HDV, HGV, и HIV) и ДНК-содержащими вирусом (HBV) необходимо на стадии прободготовок внести два внутренних контроля (РНК-ВК + ДНК-ВК).
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных РНК-содержащими вирусами (HAV, HCV, HDV, HGV, и HIV) необходимо внести внутренний контроль (РНК-ВК).
- При исследовании клинического материала только на наличие инфекций, вызванных ДНК-содержащими вирусами (HBV) необходимо внести внутренний контроль (ДНК-ВК).

Выделение РНК/ДНК производится в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов ПРОБА-НК.

При выполнении п 6.1.17. Инструкции по применению комплекта реагентов ПРОБА-НК полученный осадок РНК/ДНК растворяется в 25 мкл буфера для растворения из комплекта ПРОБА-НК.

- Для проведения обратной транскрипции использовать 16,5 мкл препарата РНК/ДНК.
- Для ПЦР-амплификации ДНК гепатита Б использовать 5,0 мкл из оставшегося объёма препарата РНК/ДНК.

2. Постановка обратной транскрипции

- 2.1. Приготовить ОТ-смесь. Смешать в отдельной пробирке:
 - 2,0 x (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
 - 1,0 x (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV +дНТФ»,
 - 0,5 x (N+1) мкл обратной транскриптазы,где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.
- 2.2. Добавить 3,5 мкл ОТ-смеси в пробирку с 16,5 мкл выделенной РНК/ДНК и встряхнуть пробирку на вортексе в течение 3-5 сек.
- 2.3. Осадить капли со стенок центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 2.4. Для получения кДНК термостатировать пробирку в течение 30 мин при 40°C, затем инактивировать обратную транскриптазу прогреванием при 95°C в течение 5 мин.
- 2.5. Осадить капли со стенок центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

Препарат кДНК готов к внесению в реакционную смесь для амплификации.

При необходимости постановки ПЦР для выявления более четырёх инфекций следует:

- К полученному препарату кДНК добавить 20 мкл буфера для растворения, таким образом, получив 40 мкл препарата ДНК.
- Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.
- Осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

При необходимости допускается хранение кДНК при температуре минус 20°C не более 1 мес.

3. Постановка амплификации

- 3.1. Промаркировать необходимое количество пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, с учётом пробирок для положительного контрольного образца «К+» и отрицательного контрольного образца «К-». При использовании ПЦР-детектора для учёта результатов амплификации (формат «FLASH») промаркировать дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

Внимание! Смесь для амплификации, запечатанная парафином, и положительный контрольный образец являются специфичными для каждой инфекции. Обращайте внимание на маркировку пакетов и пробирок.

- 3.2. Приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-полимеразы. Смешать в отдельной пробирке:
 - 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера,
 - 0,5 x (N+1) мкл Taq-полимеразы,где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К-» и «К+» (N) с запасом на 1 образец.
- 3.3. Добавить в каждую амплификационную пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл приготвленной смеси. В пробирки, маркированные «ФОН», внести по 10 мкл ПЦР-буфера без Taq-полимеразы.
- 3.4. Добавить каждую пробирку по 1 капле минерального масла (20 мкл).
- 3.5. Добавить в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл тщательно перемешанного препарата кДНК (кроме пробирок «К-», «К+» и «ФОН»). В пробирки, промаркированные «К-» и «ФОН», внести по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирку промаркированную «К+», внести 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 3.6. Осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 3.7. Установить все пробирки в блок амплификатора и провести ПЦР в режиме, приведённом в таблице 2–8, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Соответствие программ амплификации комплектам реагентов приведено в таблице 9.

4. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК

- 4.1. Формат «Форез»: результаты анализируют методом горизонтального гель-электрофореза (см. таблицу 9 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).
- 4.2. Формат «FLASH»: с помощью ПЦР-детектора «Джин», «Джин-4» (ООО «НПО ДНК-Технология») согласно инструкции к прибору.
- 4.3. Формат «Real-time»: на приборах ДТ-322, ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ (Bio-Rad) согласно инструкции к прибору.

Программы для ПЦР-амплификации кДНК HAV, HBV, HCV, HDV, HGV

Внимание! Для форматов «Форез» и «FLASH» указаны программы для амплификаторов с активным регулированием. Алгоритм регулирования «Точный», объём реакционной смеси – 35 мкл.

Таблица 2. **Формат «Форез»**

HAV, HCV, HDV, HGV, HBV

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0	0	20	5
	64,0	0	5	
	72,0	0	5	
3	94,0	0	5	40
	64,0	0	5	
	72,0	0	5	
4	10,0	хранение

Таблица 3. **Формат «FLASH»**

HAV, HCV, HDV, HBV

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов
		мин	сек	
1	94,0	1	00	1
2	94,0	0	5	5
	64,0	0	5	
	67,0	0	5	
3	94,0	0	1	40
	64,0	0	5	
	67,0	0	5	
4	10,0	хранение

Таблица 4. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

HBV, HCV

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	80,0	2	00	1		Цикл
	94,0	1	00			
2	94,0	0	10	50	v	Цикл
	62,0	0	20			
3	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 5. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

HBV, HCV

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, C°	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwfm.tmo.					
1	1	1	30 sec	80,0	
		2	60 sec	94,0	
2	5	1	20 sec	94,0	
		2	30 sec	62,0	
3	2	1	20 sec	80,0	Real Time
		Программа амплификации			
4	45	1	10 sec	94,0	
		2	20 sec	62,0	Real Time
5		10,0	storage

Примечание. Программы для формата «Real-time» являются единичными для наборов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ, ОТ-ГЕПАТОГЕН-С ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ВГБ-ГЕН, ГЕПАТОГЕН-Б КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Программы для ПЦР-амплификации кДНК HIV

Таблица 6. **Формат «Форез», «FLASH»**

Программа амплификации с активным регулированием.
Алгоритм регулирования «Точный», объем реакционной смеси – 35 мкл.

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов
		мин	сек	
1	94,0	1	30	1
2	94,0 58,0 64,0	0 0 0	20 15 5	5
3	93,0 58,0 64,0	0 0 0	5 15 5	40
4	10,0	хранение

Таблица 7. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для детектирующих амплификаторов
ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология»)

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
1	94,0	1	30	1		
2	94,0	0	10	50	V	Цикл
	58,0	0	25			
	64,0	0	15			
3	10,0	Хранение		Хранение

Таблица 8. **Формат «Real-time»**

Режим амплификации для детектирующего амплификатора
iCycler IQ (Bio-Rad Laboratories)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint, C°	PCR/Melt Data Acquisition
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwcf.tmo.					
1	1	1	30 sec	80,0	
		2	60 sec	94,0	
2	10	1	20 sec	94,0	
		2	20 sec	58,0	
		3	10 sec	64,0	
3	2	1	20 sec	85,0	Real Time
		Программа амплификации			
4	40	1	10 sec	94,0	
		2	10 sec	58,0	
		3	30 sec	58,0	Real Time
		4	20 sec	64,0	
5		10,0	storage

Таблица 9

Длины продуктов амплификации, соответствие программ амплификации комплектам реагентов

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Длина внутреннего контроля амплификации, пар нуклеотидов	Программы амплификации (№ таблицы)		
			Форез	FLASH	Real-time
Вирус гепатита А (HAV)	224	480	2	3	-
Вирус гепатита С (HCV)	253	480			4, 5
Вирус гепатита D (HDV)	128	480			-
Вирус гепатита G (HGV)	161	480		-	-
Вирус гепатита В (HBV)	295	560		3	4, 5
Вирус иммунодефицита человека (HIV)	223	480	6		7,8