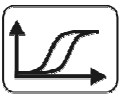
ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ
научно–производственная фирма



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом
обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С

Регистрационное удостоверение МЗ СР РФ
ФСР 2008/03892

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от 29 декабря 2008 года №10763–Пр/08

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов ОТ–ГЕПАТОГЕН-С предназначен для выявления РНК вируса гепатита С (Hepatitis C virus) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

1.2. Набор может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике для диагностики вируса гепатита С *in vitro*.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Набор реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С основан на использовании процесса обратной транскрипции РНК и последующей амплификации фрагментов кДНК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процесс амплификации заключается в повторяющихся циклах: температурной денатурации ДНК, отжига праймеров (затравок) с комплементарными последовательностями и последующей достройке полинуклеотидных цепей ДНК-полимеразой.

Внутренний контрольный образец, представляющий собой стабилизированный фрагмент РНК, добавляется в исследуемый образец на стадии выделения нуклеиновых кислот и предназначен для оценки качества всех этапов исследования.

В наборах в формате «FLASH» и «Real-time» в смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых содержит флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. В случае образования специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции, который фиксируется специальными приборами.

ДНК–зонды, использующиеся для детекции продуктов амплификации искомой нуклеиновой кислоты (НК) и внутреннего контрольного образца (ВК), мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации кДНК вируса гепатита С и внутреннего контрольного образца. Для анализа продуктов ПЦР можно использовать детектирующие амплификаторы, специализированные детекторы флуоресценции (ПЦР-детекторы) или метод электрофореза в агарозном геле.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего» старта, который обеспечивается методикой приготовления реакционной смеси, состоящей из двух слоёв, разделённых прослойкой из парафина. Смешение слоёв и превращение их в амплификационную смесь происходит только при плавлении парафина, что исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

2.2. Состав набора

В зависимости от способа детекции результатов амплификации набор выпускается в трёх форматах:

Формат «FLASH» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации с использованием ПЦР–детектора (флуоресцентная детекция по конечной точке).

Формат «Real-time» предназначен для детекции результатов ПЦР во время амплификации с помощью детектирующих амплификаторов (в режиме реального времени).

Формат «Форез» предназначен для детекции результатов ПЦР после окончания амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Набор состоит из трёх комплектов:

1. **Комплект реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ПРОБА-НК)** включает:

- лизирующий раствор – 1 флакон (30 мл);
- реагент для преципитации – 1 флакон (40 мл);
- промывочный раствор №1 – 1 флакон (50 мл);

- промывочный раствор №2 – 1 флакон (30 мл);
- буфер для растворения – 4 пробирки (по 1,25 мл);
- отрицательный контрольный образец («К–») – 2 пробирки (по 1,5 мл);
- внутренний контрольный образец (РНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл);
- внутренний контрольный образец (ДНК-ВК) – 1 пробирка (1,0 мл).

Комплект является универсальным для всех форматов.

Примечание. При хранении допускается выпадение небольшого количества осадка в лизирующем растворе, который растворяется прогреванием лизирующего раствора при 65°С.

2. **Комплект реагентов для обратной транскрипции «ОТ-МIX»** включает:

- буферный раствор для обратной транскрипции «ОТ-буфер» – 1 пробирка (200 мкл);
- смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) и праймеров для обратной транскрипции «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV+дНТФ» – 1 пробирка (100 мкл);
- обратную транскриптазу – 1 пробирка (50 мкл).

Комплект является универсальным для всех форматов.

3. **Комплект реагентов для ПЦР–амплификации** включает:

- смесь для амплификации, запечатанную парафином – 100 пробирок (по 20 мкл) для форматов «FLASH» и «Форез», 96 пробирок (по 20 мкл) для формата «Real-time»;
- Taq-полимеразу – 1 пробирка (50 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 500 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,0 мл);
- положительный контрольный образец («К+») – 1 пробирка (150 мкл).

В состав смеси для амплификации, запечатанной

парафином, входят: ПЦР-буфер, дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, праймеры. В наборах форматов «FLASH» и «Real-time» в состав смеси для амплификации входят флуоресцентные зонды.

4. Дополнительно, по запросу потребителей возможна поставка **комплекта реагентов для детекции ДНК методом гель-электрофореза,** комплект включает:

- смесь для электрофореза – 1 пакет (16,9 г);
- агарозный гель – 5 пластин.

Комплект используется в наборе формата «Форез».

2.3. Время проведения анализа – 5 ч.

2.4. Набор рассчитан на проведение 96/100 определений, включая анализ неизвестных образцов, положительных контрольных образцов и отрицательных контрольных образцов.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

Набор реагентов выявляет следующие генотипы HCV: 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 2i, 3, 4, 5a, 6.

В образцах биологического материала человека, содержащих РНК вируса гепатита С, ПЦР-детектор (формат «FLASH») или детектирующий амплификатор (формат «Real-time») должен регистрировать положительный результат. При использовании метода гель-электрофореза (формат «Форез») должна быть видна полоса оранжево–красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. (пар нуклеотидов).

В образцах биологического материала, не содержащих РНК вируса гепатита С, детектирующий амплификатор или ПЦР-детектор должен регистрировать отрицательный результат. При использовании метода гель-электрофореза полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. (пар нуклеотидов) отсутствует, а полоса, соответствующая внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н., должна быть отчётливо видна.

3.2. Чувствительность анализа: 200 копий на 1,0 мл плазмы.

3.3. Диагностическая чувствительность: 99,8%.

3.4. Диагностическая специфичность: 100%.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Мерами предосторожности при работе с комплектом реагентов является соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.2. Потенциальный риск применения набора – класс 2б (ГОСТ Р 51609–2000).

4.3. Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

4.4. Работать с набором в одноразовых резиновых перчатках без талька.

4.5. При работе с набором следует использовать только новые наконечники и пробирки.

4.6. Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов крови.

4.7. Выделение НК следует проводить в ламинарных шкафах с включённым ламинарным потоком. Приготовление реакционной смеси следует проводить в ПЦР-боксах.

4.8. Для предотвращения контаминации, этапы выделения РНК, обратной транскрипции, ПЦР и электрофореза следует проводить в раздельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабжённых комплектами полуавтоматических пипеток, халатами, стеклянной посудой и прочими принадлежностями.

4.9. Всё лабораторное оборудование, в том числе пипетки, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

4.10. Химическая посуда и оборудование, которые используются при работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

4.11. Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

4.12. Обработку помещений проводят в соответствии с требованиями СП 51609–2000. Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами.

4.13. Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обрабатывать бактерицидными облучателями до и после окончания работ в течение 1 часа.

4.14. При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

4.15. Запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Организация работы ПЦР–лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569–09.

При работе с набором реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С требуются следующие оборудование и материалы:

- обычный амплификатор (для форматов «Форез» и «FLASH») или детектирующий амплификатор (для формата «Real-time»);
- центрифуга со скоростью вращения ротора 13000 об/мин;
- термостат твердотельный, поддерживающий температуру 40–95 °С;
- микроцентрифуга/вортекс со скоростью вращения 1000–3000 об/мин;
- насос с колбой-ловушкой для удаления надосадочных жидкостей;
- холодильник бытовой с морозильной камерой;

- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл, 0,5–0,6 мл;
- пипетки автоматические одноканальные с переменным объёмом: 0,5–10 мкл, 5–40 мкл, 40–200 мкл, 200–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для автоматических пипеток с маркировкой «RNase–free, DNase–free» объёмом 1–20 мкл, 1–50 мкл, 1–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские;
- контейнер с дезинфицирующим раствором.

При работе с набором в формате «FLASH» для детекции результатов требуется:

- ПЦР-детектор.

При детекции методом электрофореза требуются:

- источник постоянного тока;
- камера для электрофореза;
- трансиллюминатор;
- колба мерная вместимостью 1,0 л;
- дистиллированная вода;
- стальная проволока диаметром 1,0 мм.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Взятие образцов периферической крови

Взятие крови проводится в пластиковые пробирки объёмом 2,5 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания содержимого пробирку переворачивают 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2. Транспортировка и хранение исследуемого материала

ВНИМАНИЕ! Время от взятия материала до получения плазмы не

должно превышать 6 часов.

Транспортировать и хранить образцы крови до начала исследования при 2–8°С.

6.3. Получение плазмы

6.3.1. Пробирки с кровью центрифугируйте при 3000 об/мин в течение 20 мин.

6.3.2. После центрифугирования отберите автоматической пипеткой верхнюю фракцию и перенесите в отдельную пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл.

Полученная плазма готова для выделения НК.

При необходимости хранить полученную плазму при температуре минус 20°С не более 3 месяцев.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала

Примечание. Перед началом работы лизирующий раствор прогреть при 65°С в течение 10 мин до полного растворения осадка.

ВНИМАНИЕ! На данном этапе используйте только наконечники с маркировкой «RNase–free, DNase–free».

7.1.1. Промаркируйте необходимое количество новых пластиковых пробирок объёмом 1,5 мл с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца «К–».

7.1.2. Внесите по 10 мкл внутреннего контрольного образца (РНК-ВК) в каждую пластиковую пробирку.

7.1.3. Внесите по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки.

7.1.4. Добавьте в пробирки для исследуемых образцов 100 мкл исследуемого образца (плазмы крови). В пробирку, промаркированную «К–», добавьте 100 мкл отрицательного контрольного образца.

7.1.5. Плотно закройте крышки пробирок, перемешайте на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.1.6. Термостатируйте исследуемые образцы и «К–» при 65°С в течение 15 мин, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

7.1.7. Добавьте 400 мкл реагента для преципитации и перемешайте пробу на вортексе в течение 3–5 сек.

7.1.8. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 15 мин.

7.1.9. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.10. Добавьте к осадку 500 мкл промывочного раствора №1, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.11. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.12. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.13. Добавьте к осадку 300 мкл промывочного раствора №2, закройте крышки пробирок и перемешайте, 3–5 раз аккуратно перевернув пробирки.

7.1.14. Центрифугируйте пробирки при 13000 об/мин в течение 5 мин.

7.1.15. Не задевая осадок, полностью удалите надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником.

7.1.16. Откройте крышки пробирок и высушите осадок при 65°С в течение 5 мин.

7.1.17. Добавьте к осадку 16,5 мкл буфера для растворения и прогрейте пробирки при 65°С в течение 10 мин, встряхните пробирки на вортексе в течение 3–5 сек, осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Примечание. При необходимости постановки анализов на несколько инфекций для одного и того же образца осадок следует растворить в 25 мкл буфера для растворения.

ВНИМАНИЕ! Увеличение объёма буфера для растворения приводит к пропорциональному разбавлению образца и уменьшению чувствительности анализа.

Чувствительность анализа, равная 200 копий/мл, для комплекта

ОТ-ГЕПАТОГЕН-С определена при растворении осадка в 16,5 мкл буферного раствора.

Полученный препарат РНК необходимо сразу использовать для постановки реакции обратной транскрипции, так как препарат РНК не подлежит хранению.

7.2. Проведение реакции обратной транскрипции

7.2.1. Разморозьте содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ–HAV+HCV+HDV+HGV+HIV+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции при 18–25°С, затем тщательно перемешайте на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.2. В отдельной пластиковой пробирке приготовьте ОТ–смесь путём смешивания буферного раствора «ОТ-буфер», праймеров «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV +дНТФ» и обратной транскриптазы:

- 2,0 х (N+1) мкл буферного раствора «ОТ-буфер»,
- 1,0 х (N+1) мкл праймеров «Праймеры ОТ-HAV+HCV+HDV+HGV+HIV +дНТФ»,
- 0,5 х (N+1) мкл обратной транскриптазы,

где N+1 – количество анализируемых на наличие РНК HCV образцов с учётом «К-» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Обратную транскриптазу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше.

7.2.3. По 3,5 мкл ОТ–смеси внесите в пробирки с выделенным образцом НК и в пробирку «К–».

7.2.4. Пробирки встряхните на вортексе в течение 3–5 сек и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.2.5. Пробирки поместите в термостат и инкубируйте при температуре 40°С в течение 30 мин, затем при температуре 95°С в течение 5 мин.

7.2.6. Осадите конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек.

Препарат кДНК готов для проведения ПЦР.

Примечание. Полученный препарат кДНК/ДНК можно использовать также при постановке ПЦР для гепатитов A, D, G и вируса иммунодефицита человека (HIV). В этом случае ПЦР

выполняется с использованием индивидуальных для каждой инфекции комплектов реагентов и программ амплификации, указанных в прилагаемых к наборам инструкциям. Учёт и интерпретация результатов выполняется согласно прилагаемым к наборам инструкциям.

При необходимости постановки ПЦР для выявления более четырёх инфекций следует:

1. К полученному препарату кДНК/ДНК добавить 20 мкл буфера для растворения.
2. Пробирки встряхнуть на вортексе в течение 3–5 сек.
3. Осадить капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.
4. Перейти к выполнению п.7.3.

Примечание. Допускается хранение кДНК/ДНК при температуре минус 20°С не более 1 мес.

7.3. Проведение полимеразной цепной реакции

7.3.1. Разморозьте при комнатной температуре (18–25°С) ПЦР-буфер из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации, затем тщательно перемешайте на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.3.2. Промаркируйте 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») промаркируйте дополнительно две пробирки «ФОН» для контроля фона флуоресценции.

7.3.3. В отдельной пластиковой пробирке, предварительно перемешав реагенты, приготовьте смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой:

- 10 х (N+1) мкл ПЦР-буфера,
- 0,5 х (N+1) мкл Taq-полимеразы,

где N+1 – количество анализируемых образцов с учётом «К–»и «К+» (N) с запасом на 1 образец.

ВНИМАНИЕ! Taq-полимеразу желательно держать вне морозильной камеры как можно меньше времени.

Смесь можно хранить при комнатной температуре (18–25°С)

не более 1 ч.

7.3.4. Перемешайте приготовленную смесь ПЦР буфера с Taq-полимеразой на вортексе и осадите капли центрифугированием при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.3.5. Во все амплификационные пробирки (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, добавьте по 10 мкл тщательно перемешанной смеси ПЦР-буфера с Taq-полимеразой.

7.3.6. В пробирки, маркированные «ФОН», внесите по 10 мкл ПЦР-буфера.

7.3.7. В каждую пробирку добавьте по 1 капле минерального масла (20 мкл), закройте пробирки.

Примечание. Во избежание контаминации вносить образцы кДНК/ДНК в амплификационные пробирки наконечниками с фильтрами.

7.3.8. Внесите в амплификационные пробирки (кроме пробирок «К–», «К+» и «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл препарата кДНК.

7.3.9. В пробирки, промаркированные «К–» и «ФОН», внесите по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения НК и обратную транскрипцию. В пробирку, промаркированную «К+», внесите 5,0 мкл положительного контрольного образца.

7.3.10. Центрифугируйте пробирки при 1000–3000 об/мин в течение 3–5 сек.

7.3.11. Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1–4, с учётом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл.

Примечание. Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8 °С в течение 1 месяца или при температуре минус 20 °С в течение 1 года.

Таблица 1. Формат «Форез»

Режим амплификации для амплификатора Терцик
(ООО «НПО ДНК–Технология»).
Алгоритм регулирования – «точный»

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

Таблица 2. Формат «FLASH»

Режим амплификации для амплификатора Терцик
(ООО «НПО ДНК–Технология»).
Алгоритм регулирования – «точный»

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

Таблица 3. 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	80,0	2	00	1		Цикл
	94,0	1	00			
2	94,0	0	10	50		Цикл
	62,0	0	20		√	
3	10,0	…	…	Хранение		Хранение

Таблица 4. 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 dynamicwf.tmo.					
1	1				
		1	00:30	80,0	
		2	01:00	94,0	
2	5				
		1	00:20	94,0	
		2	00:30	62,0	
3	2				
		1	00:20	80,0	Real Time
Программа амплификации					
4	45				
		1	00:10	94,0	
		2	00:20	62,0	Real Time
5		…	…	10,0	storage

ВНИМАНИЕ! При использовании других амплификаторов, свяжитесь с представителем компании для уточнения программы амплификации.

Примечание. Продукты амплификации можно хранить при температуре 2–8°С в течение 1 месяца или при температуре минус 20°С в течение 12 месяцев.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

8.1. Регистрация результатов амплификации с использованием ПЦР-детектора

После прохождения реакции амплификации пробирки поместить в ПЦР–детектор, оформить протокол и провести регистрацию результатов в соответствии с инструкцией к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10; для внутреннего контроля – 2,5).

8.2. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующих амплификаторов ДТ-322, ДТ-96

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола (тип анализа «Качественный») и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство по эксплуатации» для ДТ-322, ДТ-96).

8.3. Регистрация результатов амплификации с использованием детектирующего амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories)

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время амплификации. Оформление протокола и анализ результатов проводится в соответствии с инструкцией к прибору (см. «Руководство пользователя» для iCycler iQ).

8.4. Регистрация результатов амплификации с использованием электрофореза

8.4.1. Открыть крышки пробирок с продуктами амплификации и проколоть в парафине отверстие диаметром примерно 2–3 мм с помощью стальной проволоки. После прокалывания каждой пробирки проволоку промыть в ёмкости с водопроводной водой.

8.4.2. Для приготовления буфера для электрофореза содержимое пакета со смесью для электрофореза перенести в мерную колбу объёмом 1 л, добавить приблизительно 700 мл дистиллированной воды, перемешать до полного растворения и довести дистиллированной водой до метки.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°С) в течение 1 недели или при температуре 2–8°С в течение 1 мес.

8.4.3. Заполнить камеру для электрофореза буферным раствором

для электрофореза и поместить пластину с агарозным гелем в камеру для электрофореза.

Примечание. Буферный раствор для электрофореза должен покрывать пластину с гелем слоем приблизительно 3–5 мм. При работе с агарозным гелем следует обязательно надевать резиновые перчатки!

8.4.4. Осторожно внести 7,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буферный раствор.

8.4.5. Установить крышку камеры для электрофореза и подключить источник постоянного тока. Электрофорез проводить при напряжении 20 вольт/см в течение 10 мин (при ширине камеры 10 см напряжение, устанавливаемое в источнике постоянного тока, должно быть приблизительно равно 200 В).

8.4.6. После окончания электрофореза отключить источник постоянного тока, снять крышку с камеры.

8.4.7. Вынуть пластину с агарозным гелем из камеры для электрофореза, снять гель с пластины, подцепив его с края, и поместить на экран трансиллюминатора.

8.4.8. Надеть защитную маску или установить защитный экран, включить трансиллюминатор и проанализировать полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно–оранжевого цвета.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

9.1. Учёт результатов реакции с помощью ПЦР–детектора или детектирующего амплификатора

9.1.1. Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с ПЦР-детектором или детектирующим амплификатором.

9.1.2. В биологических образцах, содержащих РНК вируса гепатита С (специфический продукт):

- программа ПЦР-детектора фиксирует положительный результат. Результат амплификации внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимается.

- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции для специфического продукта.

9.1.3. В биологических образцах, не содержащих РНК вируса гепатита С:
- программа ПЦР-детектора при положительном результате амплификации внутреннего контрольного образца фиксирует отрицательный результат;
- детектирующий амплификатор регистрирует экспоненциальный рост уровня флуоресценции внутреннего контрольного образца и отсутствие экспоненциального роста кривой для специфического продукта.

9.1.4. Результат оценивается как недостоверный в случае:
- отрицательного результата на наличие РНК вируса гепатита С и отрицательного результата амплификации внутреннего контрольного образца (ПЦР-детектор);
- отсутствие экспоненциального роста уровня флуоресценции для специфического продукта и для внутреннего контрольного образца (детектирующий амплификатор).
  Это может быть вызвано присутствием ингибиторов в препарате РНК, полученном из клинического материала; неверным выполнением протокола анализа, несоблюдением температурного режима амплификации и др. В этом случае требуется либо повторная постановка амплификации препарата кДНК, либо повторное выделение препарата РНК, либо повторное взятие клинического материала.

9.1.5. Программа ПЦР-детектора фиксирует сомнительный результат в случае, если значение для специфического продукта (наличие РНК вируса гепатита С) попадает в зону неопределенности результатов (результат амплификации внутреннего контрольного образца в учёт не принимается). В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.1.6. При получении положительного результата (ПЦР-детектор) или экспоненциального роста флуоресценции (детектирующий амплификатор) для специфического продукта в отрицательном контрольном образце («К–»)

результаты всей постановочной серии бракуют. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

9.2. Учёт результатов реакции с помощью гель-электрофореза

9.2.1. В положительных образцах должны быть видны полосы оранжево–красного цвета на уровне полосы положительного контрольного образца, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. Наличие или отсутствие полосы внутреннего контрольного образца в этом случае в учёт не принимают.

9.2.2. В отрицательных образцах, в том числе в отрицательном контрольном образце, светящиеся полосы оранжево–красного цвета, соответствующие фрагменту генома вируса гепатита С должны отсутствовать, а полоса внутреннего контрольного образца размером 480 п.н. должна быть отчетливо видна.

9.2.3. В случае отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н., и отсутствия полосы оранжево-красного цвета, соответствующей внутреннему контрольному образцу размером 480 п.н., результат считают недостоверным. В этом случае необходимо повторить исследование данного образца (см.п.9.1.4).

9.2.4. В случае наличия полосы, соответствующей фрагменту генома вируса гепатита С размером 253 п.н. в отрицательном контрольном образце («К–»), результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

Таблица 5

Интерпретация результатов

Образец	Специфический продукт	Внутренний контрольный образец (ВК)	Интерпретация
Образец плазмы	+	не учитывать	Обнаружена РНК HCV
	-	+	Не обнаружена РНК HCV
	-	-	Недостоверный результат
Отрицательный контрольный образец	-	+	Отрицательный
Положительный контрольный образец	+	-	Положительный

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Срок годности набора: формат «FLASH» – 6 месяцев с даты изготовления. Форматы «Форез» и «Real-time – 9 месяцев с даты изготовления.

10.2. Комплекты реагентов для обратной транскрипции и ПЦР-амплификации, кроме пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, следует хранить при температуре минус 20°С в течение всего срока годности. Допускается хранение ПЦР-буфера, минерального масла и положительного контрольного образца при температуре 2–8°С. Допускается многократное размораживание ПЦР-буфера и минерального масла.

10.3. Комплект реагентов для выделения НК; комплект реагентов для детекции ДНК; пробирки со смесью для амплификации, запечатанной парафином, из комплекта реагентов для ПЦР-амплификации следует хранить при температуре 2–8°С в течение всего срока годности набора.

10.4. Смесь ПЦР-буфера с Taq-полимеразой следует хранить при температуре 18–25°С не более 1 ч.

10.5. Раствор буфера для электрофореза можно хранить при комнатной температуре (18–25°С) не более 7 дней или при температуре 2–8°С не более 1 мес.

10.6. Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

10.7. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.8. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и применения, установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества набора реагентов ОТ-ГЕПАТОГЕН-С, следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:
ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.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/

Номер 137-5
18.08.11

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru