

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени

(формат «Real-time»)

Реактив	Состав			
	Количество*			
	на 96 определений		на 48 определений	
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	96 пробирок	20 мкл	48 пробирок
• Раствор Taq-полимеразы	500 мкл	2 пробирки	500 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки	1,0 мл	1 пробирка
• Положительный контрольный образец («К+»)	150 мкл	1 пробирка	75 мкл	1 пробирка

* – Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации (формат «Real-time») в зависимости от наименования выпускаются на 96 или 48 определений (в пробирках 0,2 мл или в стрипованных пробирках 8 x 0,2 мл).

Инструкция по применению

1. Постановка амплификации

- 1.1. Промаркируйте пробирку с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-» и положительного контрольного образца – «К+»).
- 1.2. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы.
- 1.3. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле минерального масла.
- 1.4. Добавьте в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+»). В пробирку, маркированную «К-», добавьте 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку, в пробирку, маркированную «К+», добавьте 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 1.5. Центрифугируйте пробирки при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 1.6. Установите все пробирки в детектирующий амплификатор и проведите ПЦР в режиме, приведённом в таблицах 1–3, с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл.

Примечание. Допускается проведение амплификации по программе для мультиплексных систем.

Внимание! При работе с комплектом реагентов для выявления ДНК гарднереллы вагиналис (*Gardnerella vaginalis*) возможно проведение ПЦР в режиме, общем для всех комплектов. В этом случае необходимо обращать внимание на значение порогового цикла Ct (Cp) по FAM: положительными считают образцы, для которых значение Ct (Cp) по FAM меньше или равно 35.

2. Детекция и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК

Детекция и учёт результатов осуществляется на приборах ДТ-322 и ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология») или iCycler iQ и iCycler iQ5 (Bio-Rad) в соответствии с инструкциями к приборам.

ДНК-зонды, используемые для детекции продуктов амплификации специфического продукта и внутреннего контрольного образца, мечены флуоресцентными метками FAM и HEX соответственно.

Примечание. Тест-системы предназначены для детекции результатов ПЦР во время амплификации. В качестве альтернативного способа учёта результатов возможно использование метода гель-электрофореза (см. таблицу 4 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

Условия хранения

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК следует хранить в тёмном месте при 2–8 С в течение всего срока годности.

Примечание. Допускается хранение пробирок со смесью для амплификации, запечатанной парафином, в тёмном месте при 18–25°С в течение всего срока годности.

Срок годности комплекта – 9 месяцев с даты изготовления.

Таблица 1

Программа амплификации для амплификаторов ДТ-322, ДТ-96

№ блока	Температура, °C	мин	сек	Число циклов		Режим оптических измерений	Тип блока
				для всех комплектов, кроме <i>Gardnerella vaginalis</i>	для <i>Gardnerella vaginalis</i>		
1	80,0	1	00	1	1		Цикл
	94,0	1	30				
2	94,0	0	30	5	5	√	Цикл
	64,0	0	15				
3	94,0	0	10	45	35	√	Цикл
	64,0	0	15				
4	10,0	Хранение			Хранение

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
	для всех комплектов, кроме <i>Gardnerella vaginalis</i>	для <i>Gardnerella vaginalis</i>				
1	1	1	1	1 min	80,0	
			2	1 min 30 sec	94,0	
2	5	5	1	30 sec	94,0	
			2	45 sec	64,0	
3	45	35	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
	для всех комплектов, кроме <i>Gardnerella vaginalis</i>	для <i>Gardnerella vaginalis</i>				
Программа для считывания динамических факторов лунок dynamicwf.tmo.						
1	1	1	1	1 min	80,0	
			2	1 min 30 sec	94,0	
2	5	5	1	30 sec	94,0	
			2	45 sec	64,0	
3	2	2	1	30 sec	80,0	Real Time
			Программа амплификации			
4	45	35	1	10 sec	94,0	
			2	45 sec	64,0	Real Time
5			10,0	storage

Таблица 4

Длины продуктов ПЦР-амплификации ДНК

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Внутренний контроль, пар нуклеотидов
Хламидия трахоматис (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	321	100
Микоплазма хоминис (<i>Mycoplasma hominis</i>)	310	560
Микоплазма гениталиум (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	203	560
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и уреоплазма парвум (<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>)	532	100
Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma parvum</i>)	383	100
Уреаплазма уреалитикум (Т-960)(<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	206	560
Трихомонас вагиналис (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	218	560
Гарднерелла вагиналис (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	445	100
Нейссерия гонореи (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	329	100
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	310	560
Вирус простого герпеса 1, 2 (HSV-1,2)	261	560
Вирус герпеса человека тип 6 (HHV6)	277	560
Вирус герпеса человека тип 8 (HHV8)	293	560
Цитомегаловирус (CMV)	280	560
Вирус папилломы тип 16 (HPV16)	337	560
Вирус папилломы тип 18 (HPV18)	417	100
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс (<i>M.tuberculosis</i> – <i>M. bovis</i>)	330	100
Бордетелла пертуссис (<i>Bordetella pertussis</i>)	419	100
Хеликобактер пилори (<i>Helicobacter pylori</i>)	348	100
Коринебактерия дифтерия (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>) – токсигенные штаммы	251	560
Листерия моноцитогенес (<i>Listeria monocytogenes</i>)	67*	100
Стрептококк группы А (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	455	100
Токсоплазма гондии (<i>Toxoplasma gondii</i>)	187	560
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	185	100
Легионелла пневмофила (<i>Legionella pneumophila</i>)	383	100
Вирус варицелла зостер (VZV)	269	100

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

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time»), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 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/>