

Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для флуоресцентной детекции по конечной точке

(формат «FLASH»)

Состав (на 100 определений)

Реактив	Количество	
• Смесь для амплификации, запечатанная парафином	20 мкл	100 пробирок
• Раствор Таq-полимеразы	500 мкл	2 пробирки
• ПЦР-буфер (фон)	200 мкл	1 пробирка
• Минеральное масло	1,0 мл	2 пробирки
• Положительный контрольный образец («К+»)	150 мкл	1 пробирка

Комплекты реагентов для ПЦР-амплификации (формат «FLASH») в зависимости от наименования выпускаются на 100 или 50 определений (в пробирках 0,5 и 0,2 мл).

Инструкция по применению

1. Постановка амплификации

- 1.1. Промаркировать пробирки с запечатанной парафином смесью для амплификации (с учётом пробирок для отрицательного контрольного образца – «К-», положительного контрольного образца – «К+» и двух нормировочных пробирок – «ФОН»).
- 1.2. Добавить в каждую пробирку (кроме пробирок «ФОН»), не повреждая слой парафина, по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Таq-полимеразы. В пробирки, маркированные «ФОН», добавить по 10 мкл ПЦР-буфера («ФОН»).
- 1.3. Добавить в каждую пробирку по 1 капле минерального масла.
- 1.4. Добавить в каждую пробирку, не повреждая слой парафина, по 5,0 мкл выделенного из образца препарата ДНК (кроме пробирок «К-», «К+», «ФОН»).
- 1.5. В пробирки, маркированные «К-» и «ФОН», добавить по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего пробоподготовку, в пробирку, маркированную «К+», добавить 5,0 мкл положительного контрольного образца.
- 1.6. Центрифугировать пробирки при 1000 об/мин в течение 3–5 сек.
- 1.7. Установить все пробирки в амплификатор и провести ПЦР с учётом объёма реакционной смеси 35 мкл. Режимы амплификации приведены в таблицах 1–3. При использовании амплификатора Терцик необходимо выбрать алгоритм регулирования «Точный». Соответствие программ амплификации комплектам реагентов приведено в таблице 4.

Примечание. 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 тёмном месте при 2–8°C в течение 1 месяца. При проведении детекции пробирки должны иметь комнатную температуру (18–25°C), для чего за 1 час до проведения детекции их необходимо достать из холодильника.

2. Проведение детекции и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК

Детекция и учёт результатов ПЦР-амплификации ДНК проводится с помощью ПЦР-детекторов «Джин», «Джин-4» согласно инструкции к прибору (пороговые значения для специфического продукта составляют 1,75–2,10, для внутреннего контроля – 2,50) или с помощью гель-электрофореза (см. таблицу 4 и инструкцию для проведения гель-электрофореза).

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

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 – 6 месяцев с даты изготовления.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК для флуоресцентной детекции по конечной точке, 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/>

Режим амплификации 1

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	1	00	94,0	1	00	1
2	94,0 64,0 67,0	0 0 0	5 5 5	94,0 64,0 67,0	0 0 0	50 50 50	5
3	94,0 64,0 67,0	0 0 0	1 5 5	94,0 64,0 67,0	0 0 0	50 50 50	40
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 2

Режим амплификации 2

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	1	00	94,0	1	00	1
2	94,0 67,0	0 0	5 15	94,0 67,0	0 0	50 50	5
3	94,0 67,0	0 0	1 15	94,0 67,0	0 0	50 50	40
4	10,0	10,0	Хранение

Таблица 3

Режим амплификации 3

№ п.п.	Для амплификаторов с активным регулированием			Для амплификаторов без активного регулирования			Количество циклов
	Температура, °С	Время		Температура, °С	Время		
		мин	сек		мин	сек	
1	94,0	1	00	94,0	1	00	1
2	94,0 67,0	0 0	5 15	94,0 67,0	0 0	50 50	5
3	94,0 67,0	0 0	1 15	94,0 67,0	0 0	50 50	30
4	10,0	10,0	Хранение

Длины продуктов ПЦР-амплификации ДНК

Продукт ПЦР-амплификации	Длина продукта амплификации, пар нуклеотидов	Длина внутреннего контроля, пар нуклеотидов
Режим амплификации 1		
Хламидия трахоматис (<i>Chlamydia trachomatis</i>)	415	900
Микоплазма гениталиум (<i>Mycoplasma genitalium</i>)	440	900
Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma parvum</i>)	383	560
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) (<i>Ureaplasma urealyticum</i>)	206	560
Трихомонас вагиналис (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	218	560
Вирус герпеса человека 6 типа (HHV-6)	277	560
Вирус герпеса человека 8 типа (HHV-8)	293	560
Цитомегаловирус (CMV)	280	560
Нейссерия гонореи (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	329	560
Кандида альбиканс (<i>Candida albicans</i>)	310	560
Бордетелла пертуссис (<i>Bordetella pertussis</i>)*	419	560
Легионелла пневмофила (<i>Legionella pneumophila</i>)	383	560
Хеликобактер пилори (<i>Helicobacter pylori</i>)	348	560
Коринебактерия дифтерия (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>) токсигенные штаммы	251	560
Листерия моноцитогенес (<i>Listeria monocytogenes</i>)**	67	560
Стрептококк группы А (<i>Streptococcus pyogenes</i>)*	455	560
Токсоплазма гондии (<i>Toxoplasma gondii</i>)	187	560
Вирус Эпштейна-Барр (EBV)	185	560
Вирус варицелла зостер (VZV)	269	560
Режим амплификации 2		
Микоплазма хоминис (<i>Mycoplasma hominis</i>)	310	900
Уреаплазма уреалитикум (Т-960) и Уреаплазма парвум (<i>Ureaplasma urealyticum</i> + <i>Ureaplasma parvum</i>)	532	900
Вирус простого герпеса 1, 2 (HSV-1,2)	261	900
Вирус папилломы тип 16 (HPV 16)	367	900
Вирус папилломы тип 18 (HPV 18)	417	900
Микобактерия туберкулеза – микобактерия бовис комплекс (<i>M. tuberculosis</i> – <i>M. bovis</i>)	330	900
Режим амплификации 3		
Гарднерелла вагиналис (<i>Gardnerella vaginalis</i>)	445	900

* – продукты амплификации специфичной ДНК (*Bordetella pertussis*, *Streptococcus pyogenes*) и внутреннего контроля имеют близкие длины, разница между которыми при детекции методом электрофореза не видна.

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